Die Rolle der 2'OH Gruppe und der Einfluß von Kationen auf die Sekundärstruktur von Ribo-Homopolynukleotiden

Klaus Kölkenbeck

1972

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die Rolle der 2'OH Gruppe

und

der Einfluß von Kationen

auf

die Sekundärstruktur von Ribo-Homopolynukleotiden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Fakultät Chemie / Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Kölkenbeck
aus Berlin

München 1972

1. Berichterstatter: Prof.Dr.Th.Ackermann
2. Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.G.Zundel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1970 bis zum September 1972 im Physikalisch-Chemischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Privat-Dozent Dr.G.Zundel,
der das Thema dieser Arbeit anregte, möchte ich von Herzen für sein stets gezeigtes Interesse, für viele wertvolle Diskussionen und die großzügige Förderung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr.G.Weimann von der Firma Boehringer Biochemica Tutzing danke ich für die Hilfe bei der Beschaffung der verschiedenen Polynukleotide, Herrn Dr. Rohleder von der Bundesanstalt für Strahlenschutz in Neuherberg für die Durchführung der Atomabsorptionsanalysen.

Herrn A. Roehrich sei für die rasche Beschaffung von Chemikalien gedankt, Fräulein I.Straub für das Schreiben der Reinschrift.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Arbeit finanziell gefördert hat, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet.

Inhalt

		Seite
1.0	Einleitung und Problemstellung	1
2.0	Experimenteller Teil	4
2.1	Reinigung der Substanzen	4
2.2	Herstellung der Proben	5
2.2.1	Herstellung der Schichten im Exsikkator	5
2.2.2	Herstellung der Schichten in einer Zentrifuge	6
2.3	Das Haften der Filme auf der Ge-Scheibe	8
2.4	Vorbereitung der Probelösungen und ihre Dialyse	9
2.5	Protonierung	11
2.6	Austausch der Ionen in der Schicht	12
2.7	IR-Küvetten	12
2.8	Aufnahme der Spektren	13
2.9	Spektrographeneinstellung	14
3.0	Der Wissensstand über Sekundärstrukturen der RNS und RNS-artiger Polynukleotide als Modellsubstanzen	15
3.1	Charakteristika der DNS-Struktur	15
3.2	RNS-Sekundärstrukturen	15
3.3	Homopolymere als Modellsubstanzen	17
3.4	Protonierte Doppelhelices	18
3.5	Sekundärstrukturen von einsträngigen Homopolymeren	20
3.5.1	Poly A	20
3.5.2	Poly C	23
3.5.3	Poly U	25
4.0	Zuordnung der IR Banden	27
4.1	Auswahl der zu diskutierenden Spektralbereiche	27
4.2	Der Bereich 4000 - 2000 cm^{-1}	29
4.3	Der Bereich 1800 - 1550 cm^{-1}	31
4.3.1	Poly A	32

		Seite
4.3.2	Poly C	33
4.3.3	Poly U	34
4.4	Der Bereich 1350 - 1175 cm^{-1}	38
4.5	Der Bereich 1200 - 1000 cm^{-1}	42
4.6	Der Bereich 1000 - 550 cm^{-1}	48
5.0	Kopplung von Schwingungen der Gruppierungen des Rückgrats	54
5.1	Kopplung der Aether-Schwingung mit der 2'OD Deformationsschwingung	54 54
5.2	Kopplung der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Schwingung mit der 2'OH Deformationsschwingung	57
6.0	Veränderungen an der Riboseschwingung bei 1130 cm^{-1}	60
7.0	Die Struktur des Rückgrats	61
7.1	Die Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH Gruppe und dem Aethersauerstoff	61
7.2	Die Orientierung der Phosphatgruppe am Rückgrat	62
7.3	Die Sekundärstruktur des Mg^{2+} Poly U	64
7.4	Abhängigkeit der Ribosekonformation von den verschiedenen Kationen	68
8.0	Die Doppelhelices der Ribo-Homopolynukleotide in saurem Milieu	69
8.1	Die protonierte Poly A Doppelhelix	69
8.2	Die halbprotonierte Poly C Doppelhelix	79
9.0	Die Doppelhelix des Ca^{2+} Poly A	87
10.0	Zusammenfassung	93
	Literatur	95

1.0 Einleitung und Problemstellung

Die Entdeckung der Nukleinsäuren geht zurück auf den Schweizer Friedrich Miescher (1844 - 1895), dem es gelang, aus eitrigen Verbänden ein Material zu gewinnen, das überwiegend aus Zellkernen bestand. Aus diesen isolierte er einen bis dahin unbekannten Stoff, den er als "Nuklein" bezeichnete und für den R.Altmann 1889 die Bezeichnung "Nukleinsäure" einführte (1).

Im ersten Drittel unseres Jahrhunderts befaßte sich die Forschung vor allem mit der Aufklärung der chemischen Bausteine der Nukleinsäuren. Sie war 1930 durch die Arbeiten von Levene et al. (2) in der Lage. entsprechend der Art ihrer Pentosebestandteile zwei verschiedene Nukleinsäurearten zu unterscheiden, die Desoxyribonukleinsäure (DNS) und die Ribonukleinsäure (RNS).

In den folgenden zwei Jahrzehnten richtete sich dann das Interesse vorwiegend darauf, Einblick in die Rolle der Nukleinsäuren im biologischen Geschehen zu erhalten. Aber auch die Untersuchungen über ihren chemischen Aufbau gingen weiter und fanden ihren Höhepunkt in dem von Watson und Crick auf Grund von Röntgenuntersuchungen vorgeschlagenen Modell einer Doppelhelix als Sekundärstruktur der DNS. Im Zusammenhang damit erfolgte ihre eindeutige Identifizierung als Träger der genetischen Information (3). Hierauf schwoll der Umfang der Nukleinsäureforschung lawinenartig an.

Ueber eine Sekundärstruktur der RNS ist jedoch bis heute wenig bekannt, da es außerordentlich schwierig ist, einen Zustand ausreichenden Ordnungsgrades für Röntgenbeugungsanalysen zu erhalten.

Neben den natürlichen Ribonukleinsäuren kennt man synthetische Polynukleotide, die sich von der biologischen Substanz nur dadurch unterscheiden, daß sie statt vier Baseresten, die durch ihre Sequenz den genetischen Code beinhalten,

nur eine ganz bestimmte Base aufweisen. Diese sogenannten Homopolymeren, deren Verhalten in Lösung auf das Vorliegen geordneter Sekundärstrukturen hinweist, werden enzymatisch dargestellt. So bildet z. B. die Polynukleotid-Phosphorylase RNS-artige Polynukleotide.

Zu deren Untersuchung bietet sich die IR-Spektroskopie als ein geeignetes Verfahren an, da hierzu das Vorhandensein hochgeordneter Bereiche der Substanz nicht erforderlich ist. Die erfolgreiche Anwendung dieser Untersuchungsmethode zeigen viele Arbeiten auf diesem Gebiet.

Nukleinsäuren liegen in der lebenden Zelle nicht als freie Säuren, sondern in Form ihrer Salze vor. Davon, daß bestimmte Ionen in ihrer Chemie eine besondere Rolle spielen, zeugt nicht zuletzt die Tatsache, daß z. B. die enzymatische Polynukleotid-Synthese nur bei Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen gelingt. Durch Watson und Crick's doppelhelikale Sekundärstruktur der DNS ist der biologische Verdopplungsmechanismus zu verstehen. Umgekehrt kann vielleicht aus der Tatsache, daß bestimmte Ionen einen biologischen Mechanismus zu induzieren vermögen, auch auf bestimmte durch sie zu bildende Sekundärstrukturen geschlossen werden. Nur wenige IR-spektroskopische Arbeiten beschäftigten sich bisher mit der Untersuchung definierter Salze von Polynukleotiden.

Anknüpfend an die Untersuchungen von Zundel und Lubos (4) soll es Inhalt dieser Arbeit sein, ionenabhängige Aenderungen in den Spektren des Poly A, Poly C und Poly U [+]) aufzuzeigen und in Hinblick auf ihre Sekundärstrukturen zu diskutieren. Außerdem sollen die bereits bekannten protonierten Helices des Poly A und Poly C genauer untersucht werden.

Der Gesichtspunkt der Schwingungskopplung bei IR-Spektren von Polynukleotiden ist bisher in der Literatur sowohl bei der Bandenzuordnung, als auch im Zusammenhang damit bei Dis-

---

[+]) Steht für Salze der Poly-Adenylsäure, Poly-Uridylsäure und Poly-Cytidylsäure

kussionen über Sekundärstrukturen noch nicht genügend berücksichtigt worden.

Haben relativ benachbarte gleiche oder auch verschiedenartige funktionelle Gruppen Schwingungen mit ähnlicher Wellenzahl, so können die Schwingungen miteinander koppeln, wenn die Uebergangsmomente parallel gerichtet sind. Von Aminosäuren (5) wird berichtet, daß bei ausgeprägter Sekundärstruktur sogar alle sich alternierend wiederholenden Carbonyl- und Aminogruppen miteinander koppeln können. Im Spektrum kann man als Auswirkung die oft wesentlich aus ihren Normallagen verschobenen Banden der koppelnden Gruppen beobachten. Dieser Umstand macht das Identifizieren von Kopplungen und die richtige Zuordnung der daran beteiligten Banden oft recht problematisch. Andererseits gewährt aber gerade dieses Phänomen einen tiefen Einblick in die sterischen Verhältnisse des untersuchten Moleküls.

2.0 Experimenteller Teil

2.1 Reinigung der Substanzen

Die synthetischen Oligo-Polynukleotide Poly A, Poly C und Poly U wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. Die gelieferten Substanzen lagen nicht als Salze einheitlicher Kationen vor, sondern wiesen mehr oder minder starke Verunreinigungen mit zweiwertigen Ionen auf, die durch Dialyse schwer entfernbar sind. Deshalb mußten sie mit Hilfe eines Kationenaustauschers +), dessen Austauschkonstante im Vergleich dazu größer ist (6), gereinigt und in das Kaliumsalz übergeführt werden.

Von einwertigen Alkaliionen ist bekannt, daß sie besonders leicht austauschbar sind. Von ihren Salzen ausgehend bietet darum die Dialyse eine Möglichkeit der quantitativen Darstellung der anderen Polynukleotidsalze.

Zur Beschickung des Ionenaustauschers wurde die Ausgangssubstanz jeweils in möglichst wenig destilliertem Wasser gelöst. Bei Poly A und Poly C, die infolge des niedrigen pK_a-Wertes ihrer Basen (Adenosin-5'-Phosphat: pK_a = 3,88, Cytidin-5'-Phosphat: pK_a = 4,43) schon bei einer geringen Wasserstoffionenkonzentration teilweise protoniert werden und Doppelhelices ausbilden, mußte mit verdünnter KOH ein p_H von 9 eingestellt werden. Als Folge des im Wasser gelösten CO_2 der Luft ($CO_2 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$) erfolgt sonst teilweise Protonierung. Diese führt zu einer so starken Viskositätserhöhung der Lösung, daß sie gar nicht, oder nur unter sehr großen Substanzverlusten durch die Austauschersäule läuft. Durch Nachspülen wächst das Volumen der Lösung auf ca. 150 ml an und muß im Exsikkator über KOH stark eingeengt werden. Vor der anschließenden Gefriertrocknung ist noch das KOH, das zum Neutralisieren des CO_2 zugesetzt wurde, zu entfernen. Dies geschah durch Dialyse gegen destilliertes Wasser von p_H = 7 im Inneren einer Glove-

---

+) Ionenaustauscher Dowex, 50 Wxg, mesh 50-100, Nr. 41610 Serva, Heidelberg

box, die durch eine Umwälzpumpe mit Natronasbestfilter frei von CO_2 gehalten wurde. Bei diesem Verfahren beträgt der Substanzverlust ca. 10%.

Die von der Bundesanstalt für Strahlenschutz in Neuherberg freundlicherweise ausgeführte Atomabsorptionsanalyse ergab z. B. für das gereinigte Kaliumsalz des Poly A nach Veraschung mit aktiviertem Sauerstoff folgende Werte für den Gehalt an zweiwertigen Ionen:

Mg^{2+}: 0,01 ± 0,02 Gew.%
Ca^{2+}: 0,05 ± 0,01 Gew.%

2.2 Herstellung der Proben

Für die IR-spektroskopischen Untersuchungen mußten aus wässrigen Lösungen der Substanzen durch Entzug des Lösungsmittels dünne Filme von ca. 8 µ möglichst gleichmäßiger Stärke hergestellt werden.

2.2.1 Herstellung der Schichten im Exsikkator

Zunächst wurden die Filme, wie bei Lubos (4) beschrieben, durch Eintrocknen von ca. 8 mg gelöster Substanz im Exsikkator hergestellt. Die Probelösung wurde dazu auf eine polierte 1,5 mm starke Germaniumscheibe +) von 37 mm Durchmesser mit aufgeklebtem Teflonrahmen (lichte Weite 14 x 28 mm) aufgebracht und im evakuierten Exsikkator über gesättigter NaCl-Lösung (entspricht einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75%) eingetrocknet. Dieselbe Luftfeuchtigkeit wurde auch später in der Küvette während der Messung eingestellt. Höhere Luftfeuchtigkeiten (z. B. $BaCl_2$ = 90%) wären zwar manchmal erwünscht, bewirken aber, daß der Film an den während des Meßvorganges senkrecht angeordneten Ge-Scheiben herunterläuft.

Diese Methode der Schichtenherstellung hat zwei große Nachteile. Zunächsteinmal muß die Ge-Scheibe während des

---

+) Polykristallin, spez.Widerstand 50 Ωcm, bezogen durch die Gesellschaft für Elektrometallurgie, Düsseldorf

Eintrocknens im Exsikkator genau waagrecht austariert werden. Die eintrocknende Schicht würde sich sonst nicht gleichmäßig über die ganze Fläche verteilen. Der zweite, größere Nachteil besteht darin, daß die entstehende Folie infolge von Adhäsionskräften zwischen der Lösung und dem Teflonrahmen in der Mitte sehr dünn und nach außen immer stärker wird. Dadurch entzieht sich die Hauptmenge der Substanz dem Strahlengang des Spektrographen, so daß quantitative reproduzierbare Messungen nicht möglich sind.

2.2.2 Herstellung der Schichten in einer Zentrifuge

Diese Mängel führten zu dem Gedanken, den Adhäsionskräften durch Zentrifugalkraft entgegenzuwirken (7). Da bei einer rotierenden Zentrifuge der geometrische Ort für Kräfte gleicher Größe einen Zylinder um die Rotorachse beschreibt, wurden die Ge-Scheiben mit einem Zylinderschliff versehen. Der Radius des Schliffes entsprach dem Abstand der Ge-Scheibe von der Zentrifugendrehachse. Um Lichtverluste bei den Messungen zu vermeiden, wurde die so präparierte Ge-Scheibe mit Diamantpaste abnehmender Körnung +) poliert.

Die Zentrifugenbecher aus Aluminiumlegierung (Abb. 1), die gleichzeitig die Funktionen eines Exsikkators übernehmen mußten, waren so konstruiert, daß sie über einen kleinen Schiff'schen Hahn zu evakuieren waren. So konnte der Substanz das Lösungsmittel während des Rotierens durch ein Trockenmittel (hier: festes NaOH wegen der kürzeren Trocknungszeit) entzogen werden.

In dem herausnehmbaren und mit einer Gummidichtung versehenen Boden des Zentrifugenbechers war eine kleine Quecksilberwanne eingebaut, auf der die Ge-Scheibe mit der aufgebrachten Probelösung schwimmen konnte. Das ist möglich durch ein günstiges Verhältnis der spez. Gewichte von Ge und Hg, das sich ja auch während des Zentrifugierens nicht ändert.

+) Winter-Diamantschleifpaste (15-1 µ) bezogen durch K.Beyersdorf, München, Euro-Industriepark

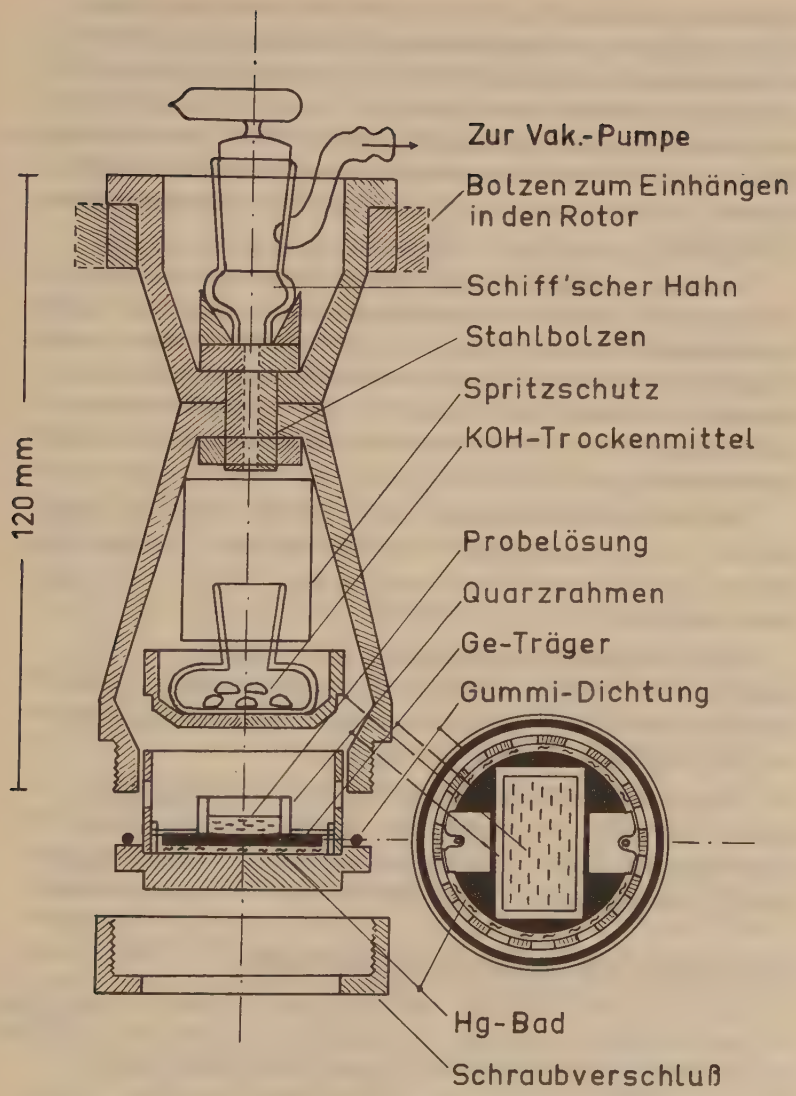


Abb. 1: Zentrifugenbecher zur Schichtenherstellung (nach (7))

Zum Schutz der Zentrifugenbecher vor Amalgambildung mußten sie innen mit einer Kunstharzschicht ausgekleidet werden. Bei laufender Zentrifuge ist der Zylinderschliff parallel zur Zentrifugenachse, was durch zwei Leitschienen erreicht wird, die ein Verdrehen der Scheibe aus dieser Lage verhindern. Aehnliche Leitschienen hat auch der Boden des Zentrifugenbechers, so daß er nur in der richtigen Stellung eingesetzt werden kann.

Um ihre vertikalen Achsen blieb die Scheibe jedoch frei beweglich, so daß sie nach einmaliger Justierung durch Ausgleichgewichte bei allen folgenden Messungen immer wieder die gleiche Stellung einnahm. Als Ausgleichgewicht diente Klebstoff, der nach Herstellung von Probeschichten zu deren Korrektur auf die Ge-Scheibe an geeigneter Stelle aufgetragen wurde.

Die Teflonrähmchen wurden durch gleichartige aus Quarz ersetzt, da die Verklebung [+]) des Germaniums mit diesem Material der hohen mechanischen Beanspruchung in der Zentrifuge nicht standhielt.

Diese Methode der Herstellung von Probeschichten reduzierte die pro Film benötigte Substanzmenge auf 3 mg bei gleicher Absorption. Die Schichtdicke hing jetzt nur noch von den eingewogenen Substanzmengen ab.

Verwendung fand eine Zentrifuge mit Swing-out-Rotor [++]). Eine in den Zentrifugenmantel eingebaute Kühlschlange in Verbindung mit einem Kühlaggregat machte über einen Thermostaten jede gewünschte Temperatur von 0 - 45°C einstellbar.

2.3 Das Haften der Filme auf der Ge-Scheibe

Viele Filme zerrissen beim scharfen Trocknen in der Küvette oder lösten sich von der Ge-Scheibe ab und rollten sich auf. Daran änderte die Herstellung in der Zentrifuge nichts.

[+]) Isamet-R3 der Firma Isarchemie München

[++]) Typ D 72, der Firma A.Hettich, Tuttlingen

Die Versuche, ein besseres Haften der Schicht durch Behandeln der Ge-Oberfläche mit überhitztem Wasserdampf oder durch Anoxydieren mit halbkonzentrierter HNO_3 zu erreichen, brachten nicht den erwünschten Erfolg. Im ersten Fall löste sich die Schicht wie gewöhnlich, im anderen Fall griff die Säure die Germaniumoberfläche zu sehr und zu unregelmäßig an.

Die besten Ergebnisse wurden durch folgendes Vorgehen erzielt: durch zweiminütiges Behandeln der Ge-Oberfläche mit Chromschwefelsäure wurde die Oberflächenfettschicht zerstört, denn danach war vollständige Benetzbarkeit erreicht. Das Haften des Filmes konnte noch durch ein leichtes Anoxydieren des Germaniums mit 30%igem H_2O_2 bei $60^{\circ}C$ während einer Stunde erhöht werden. Auf der polierten Oberfläche entstand eine dünne Oxydschicht mit einem gelblichen Schimmer. Die Null-Linie der substanzlosen Meßvorrichtung wurde dadurch nicht verändert.

2.4 Vorbereitung der Probelösungen und ihre Dialyse

Eine Substanzmenge von 3 mg pro Probe erfordert eine sehr hohe Wägegenauigkeit. Der leicht hygroskopische Charakter der Polynukleotide macht eine reproduzierbare Einwaage unmöglich. Es wurde deshalb folgendermaßen vorgegangen:

Die für eine Meßreihe benötigte Substanzmenge wurde zur Entfernung des adsorbierten Wassers scharf getrocknet. Dies geschah über Nacht in einem Exsikkator mit vorgeschaltetem N_2-Dewar bei laufender Oelpumpe, wobei sich mit der Zeit ein Vakuum von 10^{-3} Torr aufbaute. Anschließend wurde das Wägegläschen mit der Substanz in dem über die Kühlfalle vorsichtig belüfteten Exsikkator sofort geschlossen und die Wägung durchgeführt.

Die Substanz wurde in so viel bidestilliertem Wasser gelöst, daß eine Konzentration von 3 mg/ml entstand, und die Konzentration durch Wägung überprüft. Ein PVC-Fläschchen

diente als Vorratsbehälter. Nach Entnahme des je Probe benötigten ml wurde die Lösung wieder in der Kühltruhe eingefroren, um ein Zersetzen der empfindlichen Substanzen zu vermeiden.

Eine 1 ml-Insulinspritze erlaubte das genaue Abmessen gleich großer Substanzmengen und deren Ueberführung in einen Dialyseschlauch +) , der an beiden Enden verknotet wurde. Vorher mußte er zur Entfernung etwa vorhandener Ionen ca. 1^h in EDTA-Lösung ausgekocht und gründlich mit destilliertem Wasser gespült werden.

Folgende Dialyseschritte schlossen sich an, wobei ab Punkt 2) alle Operationen, bei denen die Probelösung mit Luft in Berührung kommen konnte, so auch die Ueberführung der Lösung in den Zentrifugenbecher und das Einsetzen der fertigen Schicht in die Küvette, in einer CO_2-freien Glovebox durchgeführt werden mußten. Die Dialyseschritte 2 bis 4 wurden im Kühlschrank in einer Rüttelmaschine bei etwa 8^oC durchgeführt. Dabei befand sich der Dialyseschlauch mit der Außenlösung in einem verschlossenen PVC-Fläschchen.

1) 1^h Dialyse gegen 0,01 n Kaliumkakodylat-Pufferlösung zum Entfernen von Protonen infolge von in die Vorratslösung eingeschlepptem CO_2.
2) 3^h Dialyse gegen destilliertes Wasser von p_H 7, bei stündlichem Wechsel der Außenlösung
3) 24^h Dialyse gegen 0,5 n Lösungen der Alkali- bzw. Erdalkalisalze, wobei nach etwa der Hälfte der Zeit die Außenlösung erneuert wurde.

   (Zur Herstellung der Erdalkalisalze des Poly A und Poly U konnte nur gegen eine 0,05 n Elektrolytlösung dialysiert werden, da sonst das betreffende Nukleotid ausfiel und sich auch bei der anschließenden Dialyse gegen Wasser nicht mehr auflöste. Auch bei dieser geringen Elektrolytkonzentration entstand eine schwache Trübung, die bei 4) wieder verschwand.)
4) 12^h Dialyse gegen destilliertes Wasser von p_H 7, unter mehrmaligem Wechsel der Außenlösung,zum Entfernen des Elektrolytüberschusses.

+) Visking-Schlauch "sealless cellulose tubing thin wall 8/32'', bezogen durch: Krankenhausbedarf, F.L.Fischer, Freiburg

Nachdem die Probelösung auf den Ge-Träger aufgebracht und dieser in den Zentrifugenbecher eingesetzt worden war, mußte auf 50 mm Hg evakuiert werden. Bei 25°C und Verwendung von festem NaOH als Trockenmittel beträgt so die Trockenzeit etwa 16 Stunden. Bei stärkerem Evakuieren beginnt die Probelösung zu schäumen.

Beim Poly U mußten sämtliche Operationen mit Gummihandschuhen ausgeführt werden, da speziell diese Substanz bei Berührung mit der bloßen Hand durch Uebertragung von Enzymen sehr leicht abgebaut werden kann. Zusätzlich zu den bei 25°C hergestellten Schichten wurden hier solche bei einer Zentrifugentemperatur von 5°C hergestellt, wobei sich die nötige Trockenzeit auf 48 Stunden verlängerte. Die anschließende Messung im Spektrographen fand in einer auf die gleiche Temperatur thermostatisierten Küvette statt.

2.5 Protonierung

a) Poly C

50%ige Protonierung wurde erreicht durch Zugabe der stöchiometrischen Menge an 0,01 n HCl mit einer 100 µl-Hamiltonspritze, die eine sehr genaue Dosierung ermöglichte. Nach der Säurezugabe fiel sofort ein feiner weißer Niederschlag aus. Trotzdem konnte aus einer sehr verdünnten Suspension nach mehreren Versuchen ein streuungsfreier, zusammenhängender Film hergestellt werden. Erstaunlicherweise zeigten die Spektren Unterschiede, je nachdem ob die Säurezugabe auf einmal und schnell oder tropfenweise unter ständigem Rühren mit einem Plexiglasstäbchen vorgenommen wurde.

b) Poly A

Durch Zugabe der entsprechenden stöchiometrischen HCl-Mengen wurden Folien mit einem Protonierungsgrad von 50, 100, 150 und 200% hergestellt. Hier machte sich kein von einer langsamen oder schnellen Säurezugabe abhängender Unterschied in den Spektren bemerkbar. Bis zu einem

Protonierungsgrad von 100% wurde eine starke Viskositätszunahme der Probelösung beobachtet, die bei weiterer Protonierung wieder abnahm.

2.6 Austausch der Ionen in der Schicht

Von der Möglichkeit eines Ionenaustausches in situ berichtet Pitha (8) bei Untersuchungen an DNS-Salzen. Er macht sich die Unlöslichkeit von Polynukleotiden in 80%igem Aethanol, in dem Elektrolyte bis zu einem gewissen Grad gelöst werden können, zunutze. Ein direkter Austausch von Ionen in der fertigen Folie hätte den großen Vorteil völlig identischer Schichtdicken bei allen Salzen einer Substanz. Dieses Verfahren wurde bei den 2-wertigen Ionen des Poly A, die durch Niederschlagsbildung Schwierigkeiten machten, ausprobiert. Der Ge-Träger mit einer Schicht des Li^+ Poly A (LiCl hat von allen Salzen die beste Löslichkeit in Alkohol) wurde für einige Stunden in gesättigte äthanolische $MgCl_2$-Lösung gelegt. Laut Literatur soll quantitativer Li-Mg-Austausch stattfinden. Nach mehrmaliger Erneuerung der Lösung wurde der Salzüberschuß mit reinem 80%igem Alkohol entfernt und die Folie im Exsikkator getrocknet.

Das Verfahren wurde auch an einem anderen Salz ausprobiert, von dem schon über die Dialysemethode ein Spektrum vorlag. Der Vergleich zeigte gewisse, wenn auch nur geringe Unterschiede der Spektren, so daß in jedem Falle der Dialysemethode weiter der Vorzug gegeben wurde.

2.7 IR-Küvetten

Verwendet wurden wärmeisolierte, evakuierbare und thermostatisierbare Spezialküvetten mit KRS-5-Fenstern, die bei Zundel et al. (9) näher beschrieben sind. Zur Kontrolle des Vakuums sind sie mit einem Hg-Manometer ausgerüstet, zur Kontrolle der Temperatur wurde ein Thermometer eingebaut.

Ein definierter Hydratationsgrad der Filme konnte über ein zuschaltbares Gefäß mit einer gesättigten Salzlösung eingestellt werden. Bis zur Einstellung des Gleichgewichtes mußte die Küvette, aus der vorher die Luft durch Evakuieren entfernt worden war, über Nacht in einer bei 25°C thermostatisierten Box aufbewahrt werden. Dann war es zweckmäßig, die Verbindung mit dem Salzgefäß zu unterbrechen.

Ersetzte man das Wasser der Salzlösung durch D_2O, so konnten die Filme über die Gasphase deuteriert werden. Dieser Vorgang nahm etwa 12 Stunden in Anspruch. Die D_2O-Lösung wurde mit NaCl hergestellt, das vorher mit dem Bunsenbrenner scharf getrocknet worden war. Sie mußte von Zeit zu Zeit erneuert werden.

In den Vergleichsstrahl des Doppelstrahlspektrographen wurde eine evakuierbare Gasküvette gebracht. Ihre Abmessungen waren auf die durchstrahlte Weglänge in der Meßküvette abgestimmt. Sie war ebenfalls mit zwei KRS-5-Fenstern und einer zusätzlich vorgeschobenen Ge-Scheibe versehen. Ausserdem konnte durch ein Gefäß mit Salzlösung die gleiche Luftfeuchtigkeit, wie in der Meßküvette eingestellt werden. Auf diese Art wurden die Wasserdampfabsorption und Lichtverluste durch Reflexion an den Küvettenfenstern und dem Probenträger der Meßküvette kompensiert. Vor Beginn der eigentlichen Messungen und von Zeit zu Zeit mußten die Null-Linien dieser Meßanordnung ohne Probeschicht überprüft werden.

2.8 Aufnahme der Spektren

Alle Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer Doppelstrahlspektrographen, Modell 325, aufgenommen. Den Meßraum und den Innenraum des Spektrographen hielt ein Trockenluftspülgerät Wasserdampf- und CO_2-frei. So wurden Energieverluste durch die Absorption dieser Moleküle vermieden.

2.9 Spektrographeneinstellung

Spaltprogramm: 6,5

Zeitkonstante: 3

Registriergeschwindigkeit: ca. 1 Wellenzahl/sec

Die Empfindlichkeit wurde während der Aufnahme des Spektrums mehrfach überprüft und danach die Verstärkung eingestellt.

3.0 Der Wissensstand über Sekundärstrukturen der RNS und RNS-artiger Polynukleotide als Modellsubstanzen

3.1 Charakteristika der DNS-Struktur

Sekundärstrukturen, wie die von Watson und Crick für die DNS postulierte Doppelhelix, sind bei allen Polynukleotiden nur in einem begrenzten Temperaturbereich stabile Erscheinungsformen. Es ist anzunehmen, daß auch in allen anderen Fällen, wo Polynukleotide biologisch eine Rolle spielen, eine Sekundärstruktur für ihre Funktion von großer Wichtigkeit ist.

Außer von der Temperatur hängt die jeweilige Konformation auch von der Ionenstärke ab. Letztere ist für Ribonukleinsäuren ein noch wichtigerer Stabilisierungsfaktor als für die DNS. Variiert man einen dieser Parameter über bestimmte Grenzen hinaus, so führt dies zum Zusammenbruch der doppelhelikalen Struktur. Hierunter versteht man bei der DNS den Uebergang in einen strukturlosen Zustand, den sogenannten Knäuel. Im Gegensatz zur Doppelhelix liegt nun keine regelmäßige Anordnung der Molekülgruppen mehr vor.

Nun sind alle drei charakteristischen Bauelemente der DNS, die Phosphatgruppen, die Desoxyriboseringe und die aromatischen Basen in den sterisch möglichen Grenzen zueinander statistisch angeordnet. Es besteht Grund zu der Annahme, daß bei RNS-Polynukleotiden neben doppelhelikalen Bereichen auch Einzelstränge strukturiert auftreten können.

3.2 RNS-Sekundärstrukturen

Die RNS unterscheidet sich chemisch von der DNS nur durch die in 2-Stellung am Zucker zusätzlich vorhandene OH-Gruppe und bei den Basen durch Ersatz des Thymins zu Gunsten des Uracils. Der Unterschied der beiden Basen besteht nur in der beim Uracil am C(5)-Kohlenstoff fehlenden

Methylgruppe [+]). Durch beide Veränderungen erhält jedoch die polymere Kette einen stärker hydrophilen Charakter und durch die Wasserstoffbrücken-Donatorgruppe am Rückgrat die zusätzliche Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrükkenbindungen. Fragt man nach den Gründen für die gegenüber der DNS völlig veränderte Sekundärstruktur, so macht sich die letztgenannte Eigenschaft sicherlich am gravierendsten bemerkbar.

Bei den natürlich vorkommenden Ribopolynukleotiden unterscheidet man gemäß ihrer jeweiligen biologischen Funktion verschiedene Arten. Auch in Hinblick auf deren Struktur zeigen sich gewisse Unterschiede. Die Messenger-RNS und die einiger Virenarten ist einsträngig. Auch die ribosomale RNS besteht nur aus einem Strang, doch durch dessen haarnadelartiges Zurückbiegen entstehen gegenläufige doppelhelikale Zonen. Die Transfer-RNS enthält mehrere solcher Schleifen. Von allen RNS-Arten ähnelt die Sekundärstruktur der Reo-Virus-RNS der der DNS am meisten. Sie bildet, wie diese eine gut ausgeprägte zweisträngige Doppelhelix.

Wie man sieht, gehen die Charakteristika der verschiedenen RNS-Strukturen mehr oder minder fließend ineinander über. Dabei können Einzelstränge, aber auch doppelhelikale Bereiche ausschließlich oder gleichzeitig vorhanden sein. Detaillierteres Wissen über deren Konformation konnte bis heute nicht erarbeitet werden. Die Strukturforschung traf hier auf weitaus größere Schwierigkeiten als im Falle der DNS. Ein Hauptgrund ist, daß bisher mit Ausnahme von der t.RNS keine Röntgenstrukturanalysen möglich waren. Das im Vergleich zur DNS wesentlich geringere Molekulargewicht der RNS-Arten macht es außerordentlich schwierig, Proben mit dem dazu notwendigen hohen Ordnungsgrad experimentell herzustellen. Erschwerend kommt hinzu, daß es sich meist um inhomogene Strukturen handelt.

[+]) Einige RNS-Arten weisen als zusätzlichen Unterschied Anteile der sogenannten seltenen Basen auf (10)

Die beiden Hauptfragen - a) warum liegen bestimmte Bereiche der RNS doppelhelikal vor, andere dagegen nicht, b) besitzen die einzelsträngigen Bereiche auch eine Sekundärstruktur - hängen sicher zunächst von der Basensequenz ab. Diese muß ja die Voraussetzung dafür bieten, daß sich überhaupt Basenpaare nach Watson und Crick in den doppelhelikalen Bereichen der RNS bilden können. Doch nicht minder starken Einfluß auf diese Fragen hat sicher das veränderte Rückgrat. Wird es nun durch sich stapelnde Basen, wie bei der DNS, erst in eine bestimmte Konformation gezwungen, oder liegt eine solche unter dem Einfluß der 2'OH-Gruppe von vorneherein vor? Ist letzteres der Fall, taucht wiederum die Frage auf, inwieweit kann ein "per se" strukturiertes Rückgrat von den verschiedenen Basen unterschiedlich beeinflußt werden?

3.3 Homopolymere als Modellsubstanzen

Dieser Vielfalt von schwierigen RNS-Strukturproblemen stehen, nachdem die Röntgenstrukturmethode nur bedingt anwendbar ist, nur wenige andere Meßverfahren gegenüber. Bessere Erfolgsaussichten sind bei der Untersuchung von Modellsubstanzen zu erwarten. Durch die Isolierung der Polynukleotid-Phosphorylase durch Grunberg-Manago et al. (11) war die Synthese der verschiedenen Homopolynukleotide möglich geworden. Die Homopolymeren weisen jeweils nur eine Basenart auf, besitzen aber ein Rückgrat, das mit dem der RNS identisch ist. An ihnen läßt sich, von anderen Basen ungestört, der Einfluß einer bestimmten Basenart auf dieses Rückgrat beobachten.

Bei den Homopolymeren sind bisher verschiedene Arten von Sekundärstrukturen bekannt. Untereinander bilden Poly A und Poly U bzw. Poly G und Poly C im Verhältnis 1:1 [+]) gegenläufige Doppelhelices aus (12). Diese Strukturen dürften ähnlich aufzufassen sein wie die doppelhelikalen Bereiche der RNS. Während Poly C und Poly A bei neu-

---

[+]) Je nach den Reaktionsbedingungen kann sich hier auch eine Triple-Helix Poly (A + 2 U) ausbilden (13)

tralem p_H als Einzelstränge mit dem Verdacht auf monohelikale Sekundärstruktur vorliegen, bilden sie bei Protonierung gleichläufige Doppelhelices aus. Poly U zeigt nur bei tiefen Temperaturen Anzeichen von Sekundärstruktur, während Poly I schon bei Zimmertemperatur sich in Form einer dreisträngigen Helix zusammenlagert (14).

3.4 Protonierte Doppelhelices

In den protonierten Helices von Poly A und Poly C übernimmt das Proton völlig unterschiedliche Aufgaben bei deren Stabilisierung.

Beim Poly C wird eine stabile Struktur durch Protonierung jeder zweiten Cytosinbase am N(3) Stickstoff erreicht. Von diesem bildet sich eine Wasserstoffbrückenbindung zum unprotonierten N(3) Stickstoff der Cytosinbase eines anderen Stranges aus. In Verbindung mit dem Proton übernehmen die sich sonst abstoßenden freien Elektronenpaare des N(3) eine die Basen verknüpfende Funktion. Gleichzeitig können sich zwei weitere Wasserstoffbrücken jeweils zwischen der Carbonyl- und der Aminogruppe ausbilden, so daß die Doppelhelix jeweils durch drei Wasserstoffbrücken pro Basenpaar stabilisiert wird. Diese Struktur schlugen Akrinmisi et al. (15) nach Untersuchungen über die thermische Stabilität von sauren Poly-C-Lösungen vor. Langridge und Ridge (16) kamen mit einer Röntgenstrukturanalyse zu dem gleichen Ergebnis.

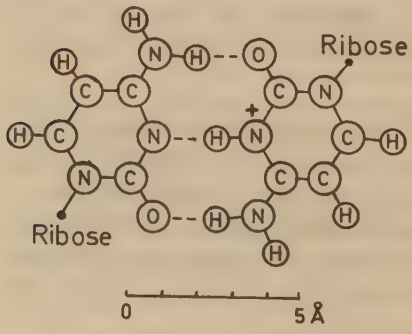


Abb. 2: Basenpaarung beim protonierten Poly C nach Akrinmisi (15)

Für die Stabilisierung der Doppelhelix des protonierten Poly A spielt das Proton nur indirekt eine Rolle, da es sich nicht an den Wasserstoffbrücken zwischen den Basen beteiligt. Für eine gute Ausbildung der Struktur sind nicht, wie beim Poly C, stöchiometrische Mengen an Protonen erforderlich. Der mögliche Spielraum ist relativ groß. Die von Rich et al. (17) röntgenographisch ermittelte Struktur besitzt Wasserstoffbrücken jeweils zwischen der Aminogruppe des einen Stranges und gleichzeitig dem N(7) Stickstoff und der $>PO_2^-$ Gruppe des anderen Stranges. Dabei nähern sich die negativ geladenen Rückgrate der beiden Stränge einander so sehr, daß ihre abstoßende Wirkung größer wird als die Tendenz der Basen, Wasserstoffbrücken auszubilden. Der N(1) Stickstoff, an den sich das Proton anlagert, befindet sich in dieser Struktur sterisch in einer Position, in der er durch eine nun positive Ladung die Abstoßungskräfte zwischen den anionischen Phosphatgruppen kompensieren kann.

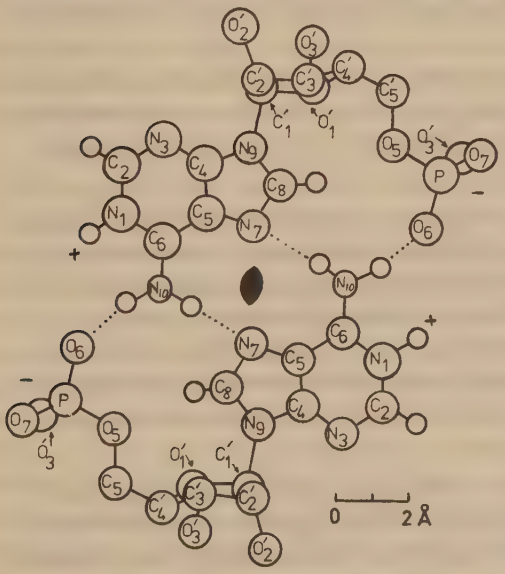


Abb. 3: Wasserstoffbrücken in der protonierten Poly A Doppelhelix nach Rich, Davies, Watson und Crick (17)

3.5 Sekundärstrukturen von einsträngigen Homopolymeren

Eine Reihe von Autoren fand auf Grund ihrer Messungen Hinweise auf geordnete Bereiche in den Einzelsträngen der Homopolymeren. Welcher Art diese Sekundärstruktur nun eigentlich ist, darüber besteht allerdings noch weitgehende Unklarheit.

3.5.1 Poly A

Die in dieser Hinsicht am besten untersuchte Substanz ist das Poly A. Der Grund dafür ist, daß die sich hier andeutende Struktur von einigen Autoren (18) (22) als Prototyp für die RNS-Struktur angesehen wird.

Zunächst fielen Fresco und Klemperer (18) bemerkenswerte Eigenheiten im ORD-Spektrum des Poly A auf. Sie deuteten sie als Anzeichen einer Struktur, die durch die Wasserstoffverbrückung aller Adeninbasen eines Stranges stabilisiert werden sollte, was, wie sich später zeigte, nicht richtig ist.

Auch Barszcz und Shugar (19) fanden als Eigentümlichkeit im UV-Spektrum eine Hypochromizität von nur etwa 50% relativ zu den Monomeren bzw. der im Knäuelzustand erwarteten Extinktion.

Michelson (20) behauptete, daß weder der Hypochromizitätseffekt noch die Fähigkeit mancher Polynukleotide, polarisiertes Licht zu drehen, nur bei durch Wasserstoffbrücken verbundenen Basen auftritt. Es genügt vielmehr, daß die Basen regelmäßig gestapelt angeordnet sind. Er berief sich auf Untersuchungen an Substanzen, wie dem ApA, die zwar Sekundärstrukturen, aber keine intramolekularen Wasserstoffbrücken haben.

Holcomb und Tinoco (21) schlossen aus ORD-Spektren in Abhängigkeit von Temperatur und p_H-Wert auf eine Sekundärstruktur des Poly A auch bei neutralem p_H. Bei Erhöhung der Temperatur stellten sie aber kein sprunghaftes Ver-

schwinden dieser Struktur wie beim Zusammenbruch der protonierten Poly A Doppelhelix fest, sondern nur eine stetige Aenderung des ORD-Spektrums. Das bedeutet, daß der Uebergang in den Knäuelzustand nicht sehr kooperativ ist und daß die Strukturabnahme nur langsam und über einen sehr großen Temperaturbereich erfolgt. Angesichts dieser Befunde postulierte der Autor eine Sekundärstruktur in Form einer Monohelix, wobei die Basen gestapelt und senkrecht zur Helixachse angeordnet sind. Es ist klar, daß bei einer solchen Struktur auch das Rückgrat eine definierte Konformation besitzen muß, wozu der Autor allerdings keinerlei Vorschläge macht.

Leng und Felsenfeld (22) ermittelten mit Hilfe der UV-Hyperchromizität einen Wert für die Schmelztemperatur T_m von etwa 50°C. Sie stellten durch Vergleich mit den Di-, Tri- und Hexanukleotiden des Adenosin fest, daß der Wert nur unwesentlich von der Länge der polymeren Kette abhängt. Die Bestimmung der Schmelzenthalpien dieser Substanzen bestätigt diesen Befund. Der auf die Zahl der Nukleotide bezogene ΔH-Wert ändert sich nur unwesentlich mit wachsender Kettenlänge, was ebenfalls zeigt, daß der kooperative Charakter dieser Strukturen nur gering ist.

Weitere wichtige Informationen erhielten Witz und Luzzati (23) mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung. Sie untersuchten Poly A Lösungen bei verschiedenen p_H-Werten. Die Streukurven, die sie erhielten, waren sowohl bei den sauren wie auch bei den neutralen Lösungen charakteristisch für stäbchenförmige Strukturen des Poly A. Dieser Befund ist im Falle der Doppelhelix des protonierten Poly A nicht weiter verwunderlich, stützt aber im anderen Falle die schon durch die beschriebenen Untersuchungsmethoden gewonnene Erkenntnis, daß auch unprotoniertes Poly A eine Sekundärstruktur besitzt. Weiter geht aus den Messungen noch hervor, daß es sich dabei nicht um eine Doppelhelix handeln kann. Auch schleifenförmige Strukturen mit doppelhelikalen Bereichen wurden zunächst vorgeschlagen (24).

Doch beide Möglichkeiten scheiden aus, da die Röntgenkleinwinkelstreumethode auch Aussagen über die Menge der streuenden Substanz pro Längeneinheit der streuenden Makromoleküle macht. Bei p_H = 6 ändert sich diese Menge um den Faktor 2, was bedeutet, daß hier ein nicht mit dem Helix-Knäuel-Uebergang der DNS zu verwechselnder Uebergang von einer einsträngigen Struktur zur zweisträngigen protonierten Doppelhelix stattfindet.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit einer Arbeit über die Strömungsdoppelbrechung des Poly A, die Wada (25) durchgeführt hat, so ergeben sich auch Anhaltspunkte über die Größenordnung dieser geordneten Zonen im Einzelstrang des Poly A. Der Autor findet erwartungsgemäß bei kleinen p_H-Werten, d. h. wenn die Doppelhelix vorliegt, Strömungsdoppelbrechung. Dieser Effekt bleibt auch noch bei p_H = 6 erhalten, wenn die Doppelhelix in die einsträngige Struktur übergeht, jedoch nicht mehr bei neutralem p_H. Da die Röntgenkleinwinkelstreuung bei Bereichen von ca. 100 Å empfindlich auf Ordnungszustände reagiert, die hier verwendete Versuchsanordnung, wie der Autor berichtet, aber erst bei Bereichen von 500 Å, liegt die Größenordnung der geordneten Bereiche des neutralen Poly A zwischen diesen Erfassungsgrenzen.

Von einer Kopplung von UV- und Ramanübergängen berichten Small et al. (26) in einer Untersuchung des Poly A mit Hilfe der Laser-Raman-Spektroskopie. Leider konnten auch daraus keine Schlußfolgerungen auf die Art der möglichen Struktur gezogen werden. Im übrigen kommen die Autoren zu denselben Aussagen, wie sie schon durch die UV-Hyperchromizitätsmessungen und die ORD-Spektren erhalten wurden. Neutrale Poly A Lösungen wurden bei 20°C und bei 80°C untersucht, dazu als Vergleichssubstanz Adenosinmonophosphat bei 2°C und bei 80°C. Dabei stellte man bei der polymeren Substanz charakterisitische Veränderungen in den bei 80°C aufgenommenen Spektren gegenüber denen die bei 20°C aufgenommen worden waren fest. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich beim Monomeren nicht. Die Veränderungen betrafen die als Ringschwingungen identifizierten Banden bei 1508 cm^{-1}, 1303 cm^{-1}

und 725 cm^{-1}, die mit steigender Temperatur intensiver wurden. Eine anschließende genauere Untersuchung dieser Banden bei einer Temperaturerhöhung in kleinen Schritten resultierte in einer Raman-Hyperchromizitätskurve, die nur langsam mit der Temperatur anstieg. Auch sie drückt aus, daß bei der Sekundärstruktur des neutralen Poly A die Kooperativität keine wesentliche Rolle spielt.

3.5.2 Poly C

ORD-Messungen, die Fasman et al. (27) an neutralen Poly C Lösungen in Abhängigkeit von der Temperatur durchführten, weisen auf eine Sekundärstruktur hin. Der hier zu beobachtende Schmelzvorgang ist allerdings auch nicht kooperativ. Ebenso wie beim neutralen Poly A geht die Struktur über einen sehr weiten Temperaturbereich verloren. Der anfängliche Verdacht, von den NH_2 Gruppen ausgehende intramolekulare Wasserstoffbrücken seien stabilisierende Faktoren dieser Sekundärstruktur, konnte entkräftet werden. Auch nachdem diese Gruppen mit Formaldehyd blockiert waren, zeigte das ORD-Spektrum weiterhin Anzeichen von Sekundärstruktur. Diese ging allerdings dann verloren, wenn man der wäßrigen Lösung des Poly C wachsende Anteile von Aethylenglykol zusetzte. Die strukturzerstörende Wirkung dieses Lösungsmittels war im ORD-Spektrum zu erkennen, aber auch an der Zunahme der UV-Extinktion. Man fand dafür die Erklärung, daß hydrophobe Wechselwirkung, verursacht durch das strukturierte Wasser in der Umgebung der Makromoleküle, einen Stabilisierungsfaktor dieser Sekundärstruktur darstellt. Wird das Wasser durch Aethylenglykol ersetzt, verschwindet er in zunehmenden Maße.

Ein Ergebnis, das sowohl diesem Befund als auch dieser Erklärung zu widersprechen scheint, erhielten Gulik et al. (28) mit der Röntgenkleinwinkelstreumethode. Sie nahmen die Streukurven des neutralen Poly C zunächst in reinem Wasser auf, dann in einem Alkohol-Wasser-Gemisch. In beiden Fällen wies das Meßergebnis auf starre, stäbchenförmige Bereiche

in der Größenordnung von 200 Å hin. Den offensichtlichen Widerspruch gegenüber Fasman's Beobachtungen erklärten sie sich damit, daß zwar sowohl durch den Temperatur- als auch durch den Lösungsmitteleffekt das Stapeln der Basen unterbunden wird, beide Größen jedoch keinen Einfluß auf eine bestehende Konformation des Rückgrats haben. Demgemäß ändert sich zwar das ORD- und UV-Spektrum, da beide Untersuchungsmethoden auf das base-stacking empfindlich reagieren, nicht aber die Streukurve. Deren Form wird weiterhin nur durch die unverändert starr bleibende Stäbchenform des Rückgrats beeinflußt. Dabei tauchte natürlich die Frage nach der Art der Rückgrat-Stabilisierung auf. Diese Autoren (28) nehmen an, daß die sich abstoßenden, negativ geladenen Phosphatgruppen die Stabilisierung bewirken.

Auch das Ramanspektrum des neutralen Poly C wurde auf Strukturhinweise untersucht (26). Es zeigt ein ähnliches Verhalten gewisser Ringschwingungen wie das Poly A. Die Intensitäten der Banden bei 1547 cm^{-1}, 1256 cm^{-1} und 790 cm^{-1} nehmen beim Erwärmen von 30°C auf 90°C zu, was den abnehmenden Prozentsatz gestapelter Basen anzeigt.

Die großen Strukturunterschiede des Poly A und Poly C in ihren protonierten Doppelhelices scheinen in den unprotonierten Einzelsträngen dieser Substanzen nicht fortzubestehen. Anzeichen deuten darauf hin, daß beide Polynukleotide bei neutralem p_H ähnliche Strukturen ausbilden.

Dies ist folgendermaßen zu verstehen. Bei den Doppelhelices richtet sich die Art der Basenpaarung nach der bei beiden Basen individuellen sterischen Anordnung der für Wasserstoffbrücken in Frage kommenden Gruppen im Zusammenhang mit der Elektronenverteilung am Basenring und seinen exocyclischen Gruppen. Wie das Poly A zeigt, können sich unter den entsprechenden Voraussetzungen sogar sehr unsymmetrische Wasserstoffbrücken zwischen den Basen und den Phosphatgruppen verschiedener Stränge ausbilden. Im Falle der Doppelhelices sind also besondere Eigenheiten der Sekundärstrukturen hauptsächlich auf Eigenheiten der Basen zurückzuführen, und diese lassen bei

beiden Substanzen nur bei saurem p_H eine Basenpaarung zu.

Aus dem Vergleich der Literatur des Poly A mit der des Poly C bei neutralem p_H läßt sich ableiten, daß die Verschiedenheit der Basen für die Sekundärstruktur der Einzelstränge keine so entscheidende Rolle mehr spielt. Die Röntgenkleinwinkelstreumethode bescheinigt ihnen in Verbindung mit der UV-Extinktion nur eine Beteiligung an der Struktur durch die Möglichkeit des Stacking, nicht aber eine strukturinduzierende Wirkung, wie sie sie am ausgeprägtesten bei der DNS, etwas weniger überschaubar bei den eben erwähnten Doppelhelices zeigen. Das strukturprägende Moment scheint hier das Rückgrat darzustellen, das seine Konformation auch dann beibehält, wenn durch Temperatur- oder Lösungsmitteleinfluß das Stapeln der Basen vollständig aufgehoben ist. Das Poly U zeigt allerdings in seiner Sekundärstruktur gegenüber dem Poly A und Poly C ein teilweise abweichendes Verhalten.

3.5.3 Poly U

Richards at al. (29) vergleichen das Poly U mit dem Uridin-5-monophosphat als monomerer Einheit und finden zwischen 25°C und 80°C keine Hypochromizität. Das bedeutet, daß das Poly U in diesem Temperaturbereich keine Struktur besitzt, bei der das base-stacking eine Rolle spielt. Beim Abkühlen auf tiefere Temperaturen beobachten sie allerdings Hypochromizität. Eine Sekundärstruktur deutet sich beim Uebergang von 10°C auf 0°C an. Die gleichen Autoren führten auch umfangreiche Untersuchungen der hydrodynamischen Eigenschaften von Poly U Lösungen durch. Aus der Abhängigkeit der Viskosität von der Größe der Scherungskräfte schlossen sie, daß keine geordnete Struktur des Poly U vorliegen kann. Selbst dann, wenn man diese Kräfte um den Faktor 4 erhöhte, veränderte sich die Zähigkeit nicht.

Auch das Ramanspektrum (26) spricht dafür, daß keine Konformationsänderung am Poly U im Temperaturintervall von 20°C - 80°C auftritt, denn es machen sich keinerlei Intensitätsänderungen an den Banden bemerkbar. Genau dasselbe läßt sich laut Sakar et al. (30) auch im ORD-Spektrum beobachten. Eine Sekundärstruktur bildet sich erst unterhalb von 10°C.

Steiner et al. (31) untersuchten das Verhalten der Zähigkeit von Poly U Lösungen in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Sie fanden eine lineare Abhängigkeit bei Zimmertemperatur und im darüberliegenden Temperaturbereich. Ihren Argumenten zufolge müßte sich eine entstehende Sekundärstruktur in einem Knick dieser Kurve äußern.

Die mit der Röntgenkleinwinkelmethode bei 3°C erhaltenen Streukurven ähneln sehr denen des neutralen Poly A und Poly C. Witz et al. (23) schließen aus gewissen Feinheiten, daß sich die Moleküle etwas flexibler verhalten müssen.

Eine sehr interessante Arbeit zeigt sehr deutlich, daß Ionen auf die Sekundärstrukturen von Polynukleotiden Einfluß nehmen können. Smutzka und Shugar (32) (33) untersuchten Poly U Lösungen im UV mit und ohne Mg^{2+} Ionen. Sie stellten fest, daß durch Mg^{2+} Ionen eine Sekundärstruktur induziert wird, die in einem nur sehr kleinen Temperaturintervall schmilzt, also ein außerordentlich kooperatives Verhalten zeigt. Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, daß die 2'OH Gruppe für die Ausbildung dieser Struktur von nicht minderer Bedeutung ist, als die Mg^{2+} Ionen. Auch bei Anwesenheit von Mg^{2+} Ionen läßt sich nämlich beim Desoxy Poly U keine Extinktionsänderung im UV feststellen. Wird die 2'OH Gruppe des Poly U methyliert, so bleibt die Sekundärstruktur auch ohne Mg^{2+} Ionen bestehen. Wie die wesentlich höher liegende Schmelztemperatur zeigt, wird sie sogar noch stabiler, aber der Schmelzvorgang findet über einen größeren Temperaturbereich statt, was Einbußen des kooperativen Verhaltens anzeigt. Ein weiterer Stabilitätszuwachs wird allerdings auch hier erreicht, wenn Mg^{2+} Ionen zugesetzt werden.

4.0 Zuordnung der IR Banden [+])

4.1 Auswahl der zu diskutierenden Spektralbereiche (hierzu Abb. 4)

Der Bereich zwischen 4000 und 2000 cm^{-1} weist in der hydratisierten Form aller Polynukleotide einen außerordentlich breiten und intensiven Bandenkomplex auf, der sich von 3800 bis 2500 cm^{-1} erstreckt. Es handelt sich um die OH Valenzschwingung und um die Oberschwingung der OH Deformationsschwingung des über Wasserstoffbrücken adsorbierten Wassers; letztere gewinnt durch Fermi-Resonanz mit der OH Valenzschwingung an Intensität (34). Nur ganz schwach deutet sich eine Struktur an. Diese wird beim Trocknen durch die Entfernung des adsorbierten Wassers zwar wesentlich ausgeprägter, doch auch die nun stärker hervortretenden Banden sind breit. Es handelt sich nun um Schwingungen der $-NH_2$ Gruppen. An ihnen sind bei den ionenabhängigen Messungen keine Veränderungen festzustellen. Nur beim Protonieren macht sich eine Anhebung des Untergrundes auf der kurzwellenzahligen Flanke des Bandenkomplexes bemerkbar. Deswegen wurden in diesem Bereich nur die verschieden stark protonierten K^+ Salze des Poly A und die halbprotonierte Form des Poly C mit den entsprechenden unprotonierten Substanzen verglichen.

Der interessanteste und aussagekräftigste, zugleich aber auch bandenreichste Teil des Gesamtspektrums liegt zwischen 1800 und 1000 cm^{-1}. In allen Polynukleotidspektren fallen hier drei charakteristische Zentren mit besonders intensiven Banden auf. Jedes von ihnen stellt einen aus mehreren Banden bestehenden Komplex dar, an denen bei den Messungen Veränderungen durch Ioneneinfluß beobachtet wurden. Aus Gründen der besseren Uebersicht erschien es sinnvoll, diese drei Zentren voneinander getrennt zu behandeln. In ihnen werden die Salze aller Polynukleotide, die gemessen wurden, einander

---

[+]) Ein Teil der folgenden Zuordnungen ist der Dissertation von W.D.Lubos (4) entnommen

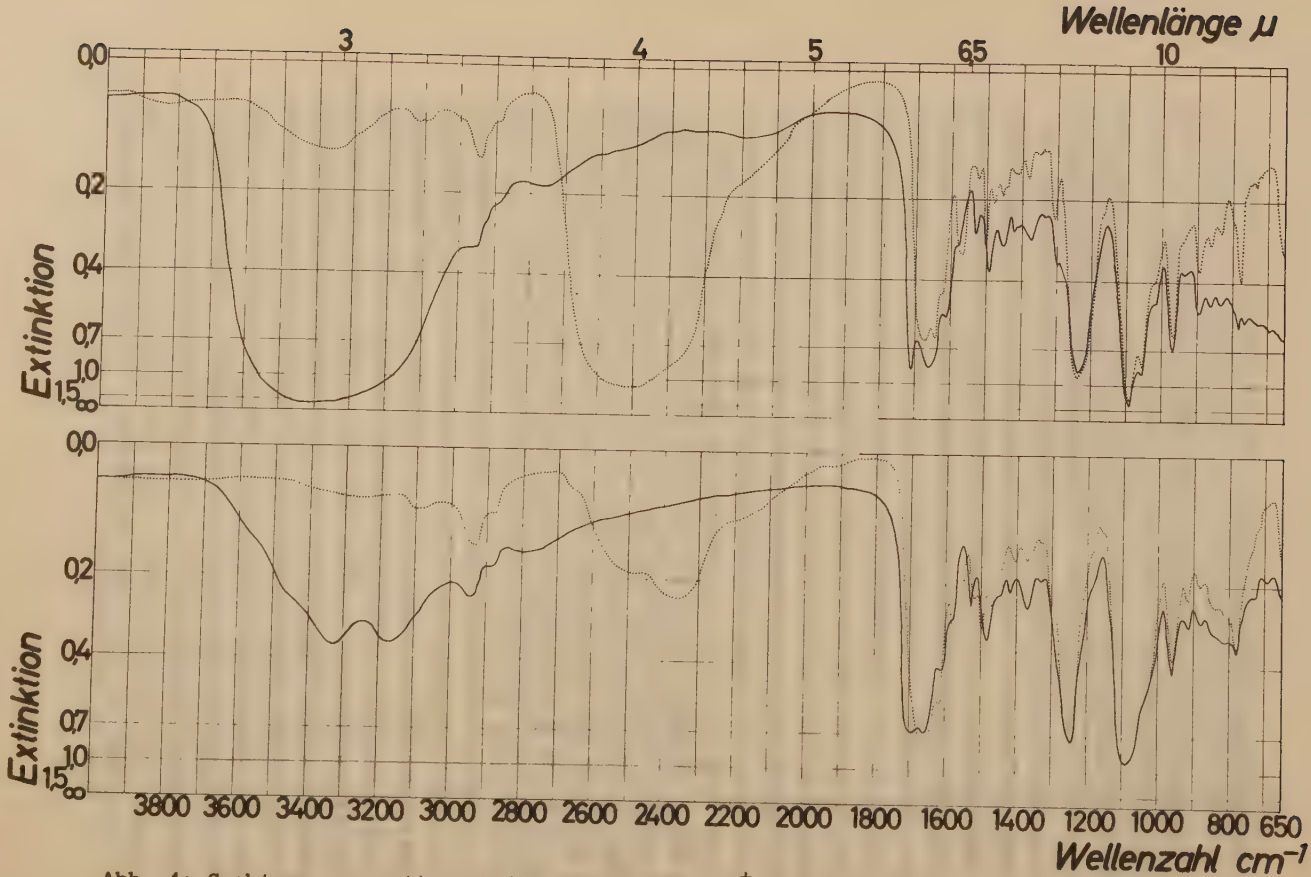


Abb. 4: Spektren von nativer Kalbs-Thymus-DNS (Cs^+ Salz) a) 75% rel.Luftfeuchtigkeit
b) scharf getrocknet
——— H, ····· D

direkt gegenübergestellt. Dies ist nötig, da sich so Gesetzmäßigkeiten, die auf einem abgestuften Ioneneinfluß beruhen, besser erkennen lassen. Der Teilbereich dazwischen zeigt Ringschwingungen der Basen, die von Ionen meist nicht beeinflußt werden. Nur im Spektrum des Ca^{2+} Poly A übersteigen die Veränderungen völlig den Rahmen dessen, was sonst bei Anwesenheit verschiedener Ionen bei Polynukleotiden beobachtet wird. Da hier eine völlig andere Sekundärstruktur vorliegen muß, wird, wie auch bei den protonierten Substanzen der Gesamtbereich zusammenhängend behandelt (Kap. 9).

Unterhalb von 1000 cm^{-1} liegt der bisher am wenigsten erforschte Teil der Polynukleotid-Spektren. Gegenüber den höherwellenzahligen Bereichen nehmen die Intensitäten der Banden stark ab. Beim Trocknen verschwindet die extrem breite Bande der Torsionsschwingung der Wassermoleküle, die ihren Schwerpunkt um 710 cm^{-1} hat. Auffallende Veränderungen treten bei vergleichbaren Substanzen nur bei der Protonierung auf. In der Reihe der verschiedenen Ionen sind, wieder mit Ausnahme des Ca^{2+} Poly A, nur geringe Bandenverschiebungen zu beobachten.

4.2 Der Bereich 4000 - 2000 cm^{-1}

In den IR-Spektren von DNS (Abb. 4) r.RNS, Poly (A+U) und Poly (G+C) verursacht die $-NH_2$ Gruppe ein intensives Bandenpaar. Die eine Komponente liegt um 3330 cm^{-1}, die andere um 3180 cm^{-1}. Dieses Bandenpaar entsteht durch die NH Valenzschwingung der Wasserstoffbrücken-gebundenen NH Gruppe der $-NH_2$ Gruppen und durch die Oberschwingung der $-NH_2$ Deformations-Schwingung, wobei diese Schwingungen über Fermiresonanz gekoppelt sind (35). Dies ergibt sich durch Vergleich mit Arbeiten an Aminen (36) - (40). Die schwache Schulter im Bereich 3500 - 3400 cm^{-1} ist den Valenzschwingungen der nicht Wasserstoffbrücken-gebundenen NH Gruppe zuzuschreiben. In der denaturierten DNS verschwindet diese Doublettstruktur weitgehend,

denn die Stärke der Fermiresonanz hängt von der Stärke der Wasserstoffbrücken ab. In der denaturierten DNS sind die Wasserstoffbrücken als Folge der Abwinkelung und Dehnung verschieden stark, und damit verfließt die Doublettstruktur zu einer breiten Bande.

Auch das Poly A und Poly C zeigt bei $p_H = 7$ ein intensives Bandenpaar in dieser Gegend (Abb. 36 und 31), das von Schwingungen gebundener NH Gruppen herrührt, die mit der Oberschwingung der $-NH_2$ Deformationsschwingung gekoppelt sind. Bindungspartner der $-NH_2$ Gruppen ist in diesen Fällen das Hydratwasser.

Die OH Valenzschwingung der 2'OH Gruppe ist nicht zu identifizieren. Der Vergleich mit DNS-Spektren erbrachte keinen Anhaltspunkt für die Anwesenheit einer entsprechenden Bande. Es ist sehr wahrscheinlich, daß ihre Absorption von der breiten Bande der OH Valenzschwingung des Wassers verdeckt wird.

Im Bereich zwischen 4000 cm^{-1} und 2000 cm^{-1} sind ausserdem noch die CH Valenzschwingungen der Basen und der Ribose zu finden. Erstere erscheinen infolge des aromatischen Charakters der Basen bei höheren Wellenzahlen.

Poly A	Poly C	
3455	3455	Valenzschwingungen freier NH Gruppen der $-NH_2$ Gruppe
3335	3340	Valenzschwingungen gebundener NH Gruppen, gekoppelt mit der Oberschwingung der $-NH_2$ Deformationsschwingung
3190	3200	
3125	3095	CH Valenzschwingungen der Basen
2945	2950	CH_2 Valenzschwingungen der Ribose
2890	2885	CH Valenzschwingungen der Ribose

Tabelle 1: Bandenlagen (in cm^{-1}) der unprotonierten, nach H_2O Hydratation getrockneten K^+ Salze

4.3 Der Bereich 1800 - 1550 cm^{-1} (Abb. 5 und 6)

In diesem Spektralbereich liegen nur Banden der Basenreste. Die einzelnen Banden sind den In-plane-Schwingungen der Basen und der Deformations-Schwingung der $-NH_2$ Gruppe zuzuordnen. Die In-plane-Schwingungen sind Ringschwingungen mit überwiegendem Valenzschwingungsanteil der C=C, C=O und C=N Doppelbindungen. Die Out-of-plane-Schwingungen der Basen werden bei viel kleineren Wellenzahlen erwartet.

Diese Zuordnung wird durch Untersuchungen an orientierten Filmen der DNS mit polarisiertem IR bestätigt. Tsuboi et al. (41) fanden, daß die Uebergangsmomente aller Banden dieses Spektralbereiches senkrecht zur Ausdehnungsrichtung der polymeren Kette stehen. Dieser Befund stimmt mit der Anordnung der aromatischen Ringsysteme der Basen in doppelhelikalen Strukturen überein.

Die in der hydratisierten Form der Filme bei 1640 cm^{-1} (9) erwartete H_2O Scherenschwingung konnte bei den hier betrachteten Polynukleotiden nicht beobachtet werden. Sie geht in dem Gesamtkomplex unter und äußert sich daher nur in dessen geringfügiger Intensitätserhöhung, die beim scharfen Trocknen zurückgeht. Ebenso wie die $-NH_2$ Deformationsschwingung verschwindet auch die H_2O Scherenschwingung nach H-D-Austausch völlig aus diesem Bereich.

Starke Veränderungen sind in diesem Spektralbereich zu erwarten, wenn bei regelmäßiger Anordnung der Basenreste Uebergangsmomente von Schwingungen parallel ausgerichtet werden und somit koppeln.

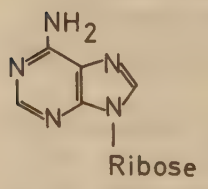
Die Identifizierung solcher gekoppelter Schwingungen und die richtige Zuordnung der beteiligten Banden ist oft sehr schwer, da diese weit aus ihrer Normallage verschoben werden können. Andererseits ist ihr Informationsgehalt sehr groß, da sie direkten Einblick in die sterischen Verhältnisse gewähren. Auch die veränderte Elektronenverteilung in den

Purin- bzw. Pyrimidinringen der Basen bei deren Protonierung oder Deprotonierung wirkt sich besonders in diesem Teil des Spektrums aus.

DNS zeigt eine intensive Bande bei 1705 cm^{-1} (D_2O: 1685 cm^{-1}), die als typische Strukturbande angesehen wird. Ihre Extinktion ist proportional der Anzahl der gepaarten Basen. Kyogoku (42) und Fritsche (43) nutzten diese Eigenschaft, um im IR bei dieser Wellenzahl durch temperaturabhängige Intensitätsmessungen die Schmelztemperatur T_m zu bestimmen. Doppelhelikale RNS (44), sowie RNS-DNS-Hybride (45) weisen diese In-plane-Schwingung der wasserstoffverbrückten Basenpaare auch auf, ebenso wie die folgenden künstlichen Polynukleotide mit doppelhelikaler Struktur: Poly A+U (H_2O : 1710 cm^{-1}, D_2O : 1695 cm^{-1}), Poly A+T (H_2O : 1705 cm^{-1}, D_2O : 1676 cm^{-1}) und Poly G+C (H_2O : 1705 cm^{-1}, D_2O : 1687 cm^{-1}). Erwartungsgemäß zeigt die einsträngige f_1-Phagen-DNS diese Bande nicht.

Auch Banden im protonierten Poly A (H_2O : 1715 cm^{-1}, D_2O : 1664 cm^{-1}) und im Ca^{2+} Poly A (H_2O : 1706 cm^{-1}, D_2O : 1696 cm^{-1}) scheinen ähnliche strukturbedingte Ursachen zu haben.

4.3.1 Poly A



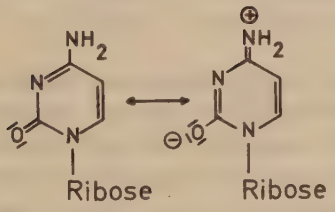
Poly A zeigt bei neutralem p_H drei Banden (Abb. 5 und 6) bei allen Alkali- und Erdalkalisalzen, mit Ausnahme seines Ca^{2+} Salzes. Die angegebenen Werte beziehen sich auf das K^+ Salz und weichen nur um 2 - 3 cm^{-1} von denen der anderen Salze ab. Sie liegen bei 1654 cm^{-1}, 1608 cm^{-1} und 1578 cm^{-1}. Nach dem H-D-Austausch erkennt man noch zwei Banden, eine bei 1625 cm^{-1} und eine bei 1575 cm^{-1}.

Die in der H-Form bei 1578 cm^{-1} beobachtete Bande zeigt ein völlig anderes Verhalten beim Protonieren als die Bande bei 1575 cm^{-1} in der D-Form. Es muß sich um verschiedene Schwingungen handeln. Die Bande bei 1578 cm^{-1} ist der $-NH_2$ Deformationsschwingung zuzuordnen. Sie verschwindet beim Deuterieren. Die beiden anderen Banden verschieben sich um ca. 30 cm^{-1} nach kleineren Wellenzahlen. Es sind Ringschwingungen von Gruppierungen mit hohem Doppelbindungsanteil.

1654	(1625)	Ringschwingung
1608	(1575)	Ringschwingung
1578	-	$-NH_2$ Deformationsschwingung

Tabelle 2: Schwingungen der Adeninbase im Poly A (in cm^{-1}) H_2O (D_2O)

4.3.2 Poly C



Beim Poly C werden hier die C=O Valenzschwingung, die $-NH_2$ Deformationsschwingung, sowie Ringschwingungen von Gruppen mit hohem Doppelbindungsanteil erwartet.

C=O Valenzschwingungen findet man normalerweise in der Gegend um 1700 cm^{-1}. Da die höchstgelegene Schwingung in diesem Bereich aber erst bei 1655 cm^{-1} erscheint, weist dies auf einen erhöhten Einfachbindungscharakter der Carbonylgruppe hin. Diesen kann man sich durch die oben angedeutete Art der Mesomeriestabilisierung erklären (4). Tsuboi (46) beobachtet an dieser Bande eine Verschiebung von -5 cm^{-1} bei ^{15}N-markiertem Cytosin, was ihr den Charakter einer reinen Carbonylschwingung abspricht.

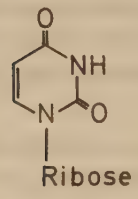
Durch Deuterieren verschwindet bei 1607 cm^{-1} die $-NH_2$ Deformationsschwingung. Dadurch ist an der Flanke der Carbonylschwingung bei 1620 cm^{-1} eine andere Bande zu erkennen.

Da nur noch Ringschwingungen zu erwarten sind, kann es sich nur um eine solche handeln. Im Cytidin spricht Shimanouchi (47) der entsprechenden Bande bei 1615 cm^{-1} einen erhöhten C=N Doppelbindungscharakter zu. Auch die schwache Schulter bei 1579 cm^{-1} ist nach dem Verschwinden der $-NH_2$ Deformationsschwingung zu beobachten. Sie verschiebt sich kaum und ist eine Ringschwingung mit erhöhtem C=C Doppelbindungsanteil. Alle Banden ändern ihre Lage und Intensität beim Trocknen nur unwesentlich.

1655	(1655)	C=O Valenzschwingung
-	(1620)	Ringschwingung (hoher C=N Anteil)
1607	-	$-NH_2$ Deformationsschwingung
1579	(1578)	Ringschwingung (hoher C=C Anteil)

Tabelle 3: Schwingungen der Cytosinbase (in cm^{-1}) im Poly C. H_2O (D_2O)

4.3.3 Poly U



Da sich die beiden Carbonylgruppen des Poly U in verschiedener chemischer Umgebung befinden, ist zu erwarten, daß sie bei verschiedenen Wellenzahlen absorbieren. Im Spektrum der deuterierten Substanz erkennt man zwei starke Banden, die 39 cm^{-1} voneinander entfernt sind. Die niedriger gelegene Bande bei 1658 cm^{-1} entspricht der C(4)=O Gruppe, da diese in ihrer konjugierten Stellung zur C=C Doppelbindung besser stabilisiert ist, während die C(2)=O Gruppe bei 1697 cm^{-1} absorbiert. Miles (48) bestätigt diese Zuordnung durch die Feststellung, daß sich in Uridin, das in 4-Stellung ^{18}O-substituiert war, nur die tiefer gelegene Bande um -5 cm^{-1} verschiebt.

In der undeuterierten Form beobachtet man nur noch eine intensive Bande mit einer Halbwertsbreite von etwa 60 Wellenzahlen und einem Maximum bei 1690 cm^{-1}. Durch Kopplung mit

der NH Deformationsschwingung wird die Bande bei 1658 cm^{-1} nach größeren Wellenzahlen verschoben und fällt mit der Bande der anderen Carbonylschwingung zusammen. Dies erkennt man in Abb. 22. Beim Uebergang von D_2O nach H_2O Hydratation taucht bei 1422 cm^{-1} die NH Deformationsschwingung auf. Durch Kopplung mit dieser Schwingung wird die C(4)=O Valenzschwingung nach größeren Wellenzahlen gedrückt und die CN Valenzschwingung bei 1297 cm^{-1} nach kleineren Wellenzahlen. Von einer Kopplung der CN Valenzschwingung mit der NH Deformationsschwingung in Anilinderivaten berichtet Bellamy (49). Eine schöne Bestätigung findet dies durch den Befund, daß im 1,3-Dimethyluracil, wo der N(3) Stickstoff methyliert ist, keine Kopplung mehr stattfindet und damit sind auch in der H-Form bei dieser Verbindung zwei Carbonylbanden zu beobachten (50).

	(1697)	Valenzschwingung der C(2)=O Gruppe
1690	(1658)	Valenzschwingung der C(4)=O Gruppe
1622	(1620)	Ringschwingung (hoher C=C Anteil)

Tabelle 4: Schwingungen der Uracilbase im Poly U (in cm^{-1})
H_2O (D_2O)

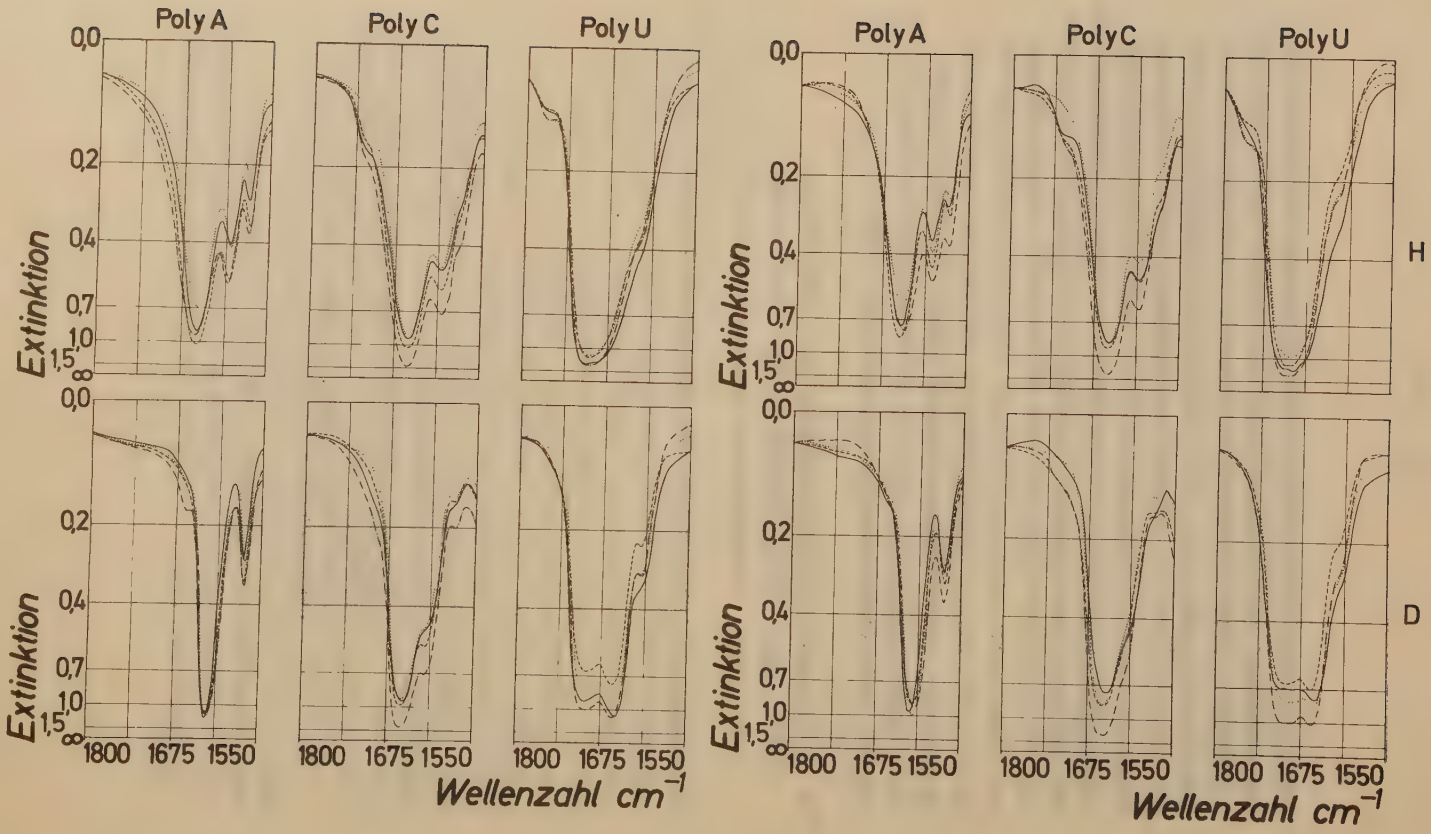
Abb. 5 und 6 (siehe S. 36 und 37):

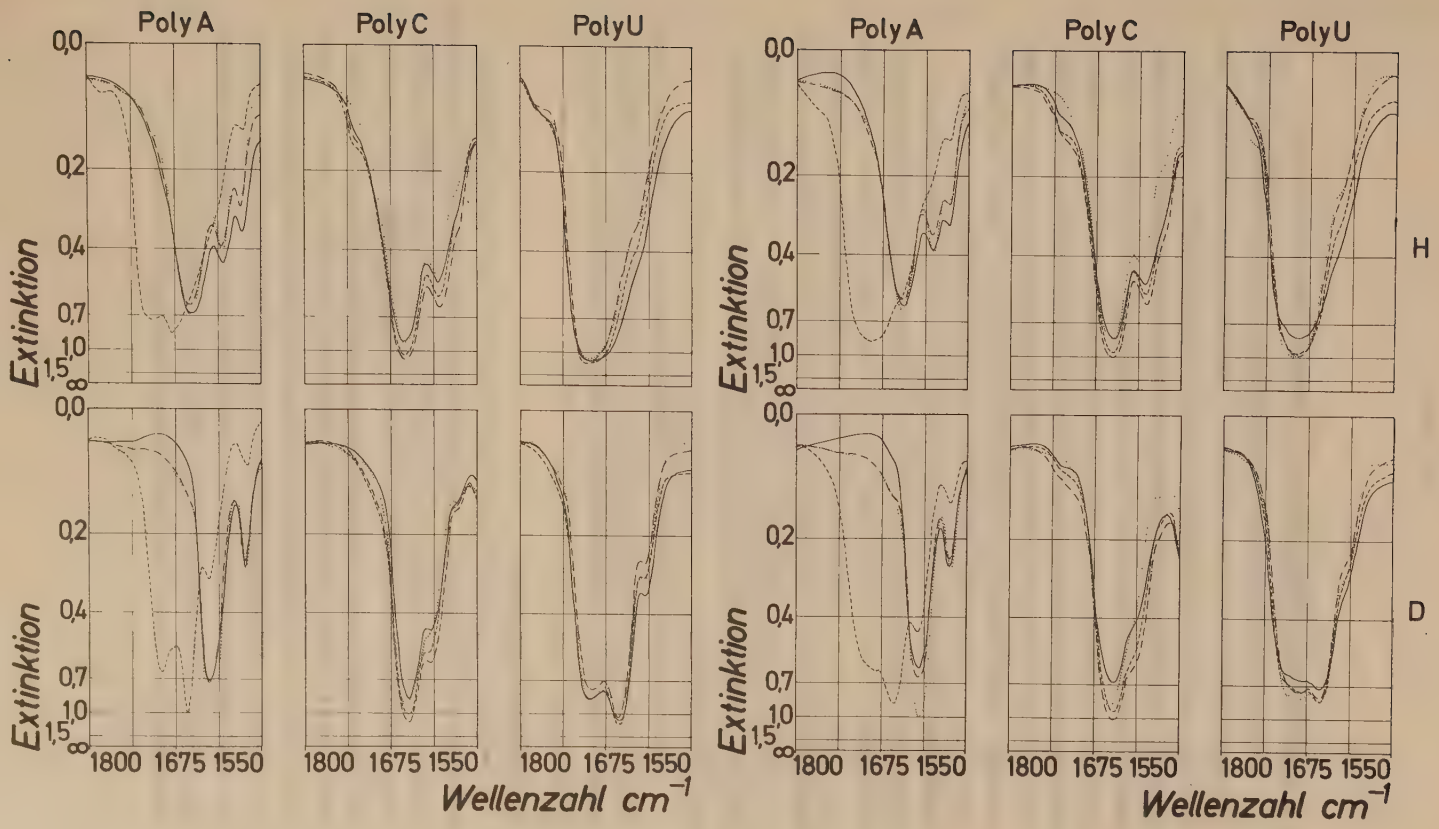
IR-Spektren von Salzen des Poly A, Poly C und Poly U

links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
rechts:scharf getrocknet

Abb. 5: Li^+———, Na^+-----, K^+-.-.-, Cs^+·····

Abb. 6: Mg^{2+}———, Ca^{2+}-----, Ba^{2+} -.-.-, Cs^+·····


Poly A
Poly C
Poly U
Poly A
Poly C
Poly U
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H
D
1800 1675 1550
Wellenzahl cm⁻¹


Poly A
Poly C
Poly U
Poly A
Poly C
Poly U
Extinktion
Extinktion
Extinktion
Extinktion
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
H
D
1800 1675 1550
1800 1675 1550
1800 1675 1550
1800 1675 1550
1800 1675 1550
1800 1675 1550
Wellenzahl cm⁻¹
Wellenzahl cm⁻¹

4.4 Der Bereich 1350 - 1175 cm^{-1} (Abb. 7 und 8)

In den Spektren aller Polynukleotide fällt eine sehr intensive Bande bei etwa 1240 cm^{-1} auf, die ihre Position beim Deuterieren nur wenig ändert. Ihre Zuordnung zur antisymmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung ist in der Literatur nicht umstritten. Bisweilen zeigt diese Bande Doublettstruktur, die jedoch beim Deuterieren stets verschwindet. Die einzige deuterierungsempfindliche Bande, die in diesem Bereich auftreten kann und allen Homoribonukleotiden gemeinsam ist, ist die In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe. Somit muß diese Schwingung in der breiten Bande enthalten sein. Bei dieser Schwingung handelt es sich allerdings um keine reine OH Deformationsschwingung, denn die entsprechende OD Deformationsschwingung liegt um 1030 cm^{-1} (51). Der Isotopiefaktor ist demnach 1,20, d. h. kleiner als 1,37. Die Doublettstruktur der Bande um 1240 cm^{-1} entsteht, wie in Kap. 5.0 ausführlich diskutiert wird, durch Kopplung der antisymmetrischen Valenzschwingung der $>PO_2^-$ Gruppe mit der In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe.

Alle anderen Banden in diesem Bereich sind wesentlich weniger intensiv. Erwartet werden noch die CN Valenzschwingung, die In-plane-Deformationsschwingung der ND_2 Gruppe, sowie die D_2O Scherenschwingung bei 1205 cm^{-1} (52).

CN Valenzschwingungen

Beim Poly A findet man die Bande der CN Valenzschwingung bei 1290 cm^{-1}. Beim Ca^{2+} Salz wird sie nach 1273 cm^{-1} verschoben. In Kap. 9.0 wird gezeigt, daß speziell in der Sekundärstruktur dieses Salzes die Adeninbase in der Iminoform vorliegt und sich der Wasserstoff der Aminogruppe an einen Ringstickstoff anlagert. Damit liegen ähnliche Verhältnisse wie beim Poly U (siehe S. 39) vor, die CN Valenzschwingung wird durch Kopplung mit der In-plane-Deformationsschwingung der NH Gruppe nach kleineren Wellenzahlen verschoben. Diese Deutung wird dadurch bestätigt, daß im Falle des deuterierten Ca^{2+} Salzes diese CN Schwingung in ihrer ursprünglichen Lage gefunden wird.

Beim Poly C beobachtet man die Bande der CN Valenzschwingung bei 1290 cm^{-1} unbeeinflußt vom Deuterieren.

In der D-Form des Poly U zeigt sich eine mittelstarke Bande bei 1297 cm^{-1}. Es fällt auf, daß sie in der H-Form in die Phosphatschwingung hineingeschoben wird. Bellamy (49) erklärt solche Verschiebungen von CN Valenzschwingungen durch Kopplung mit der NH Deformationsschwingung (siehe auch S. 35). Hiernach ist diese Bande der CN Valenzschwingung zuzuschreiben.

Mg^{2+} Poly A:	1336	(1340)	Ringschwingung des Adenins (4)
	1304	(1305)	CN Valenzschwingung
	1242	(1236)	antisymmetrische Valenzschwingung der $>PO_2^-$ Gruppe
	1224	-	In-plane-Deformationsschw.der 2'OH Gruppe
K^+ Poly C:	1290	(1290)	CN Valenzschwingung
	1244	(1238)	antisymmetrische $>PO_2^-$ Valenzschwingung (verdeckt δ 2'OH)
K^+ Poly U:	1298	(1298)	cyclische CN Valenzschwingung des Uracils gekoppelt mit der NH Deformationsschw.
	1238	(1240)	antisymmetrische $>PO_2^-$ Valenzschwingung (verdeckt δ 2'OH)

Tabelle 5: Bandenlagen (in cm^{-1}) im Bereich 1350 - 1175 cm^{-1} bei 75% rel. Luftfeuchtigkeit H_2O (D_2O)

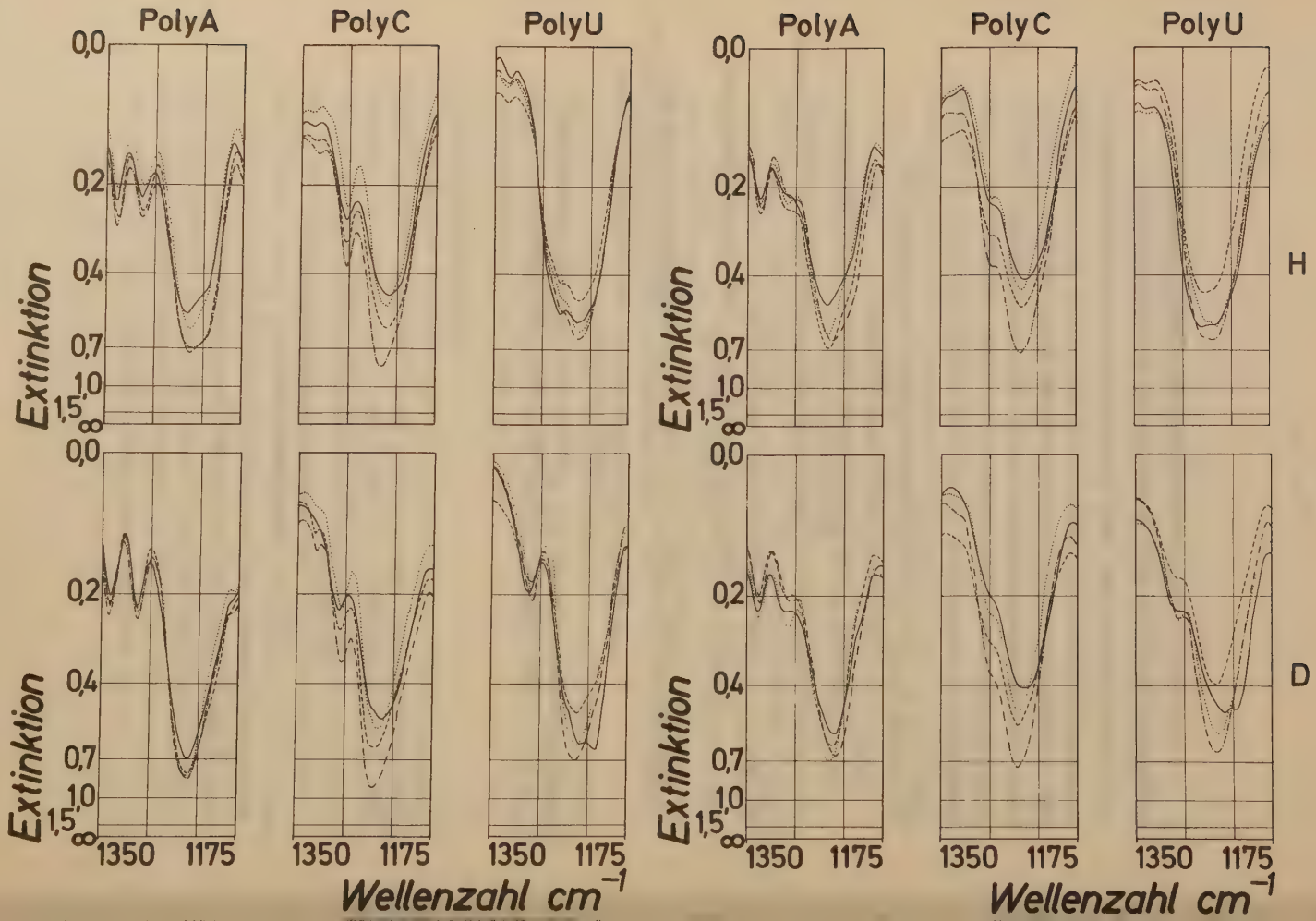
Abb. 7 und 8 (siehe S. 40 und 41):

IR-Spektren von Salzen des Poly A, Poly C und Poly U

links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
rechts:scharf getrocknet

Abb. 7: Li^+ ———, Na^+-----, K^+ -·-·-, Cs^+·····

Abb. 8: Mg^{2+}———, Ca^{2+}-----, Ba^{2+}-·-·-, Cs^+·····


Poly A
Poly C
Poly U
Poly A
Poly C
Poly U
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H
D
1350
1175
Wellenzahl cm⁻¹

Poly A
Poly C
Poly J
H
D
Extinktion
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
1350
1175
Wellenzahl cm⁻¹

4.5 Der Bereich 1200 - 1000 cm^{-1} (Abb. 9 und 10)

In diesem Bereich überlagern sich in der H- und D-Form mehrere dicht beieinanderliegende Banden, die je nach Art der Sekundärstruktur ihre Lagen und Intensitäten ändern.

Erwartet wird die symmetrische Valenzschwingung der $>PO_2^-$ Gruppe in der Gegendum 1080 cm^{-1}, wo sie auch bei anderen phosphororganischen Verbindungen des Typs $R_2PO_2^-$ zu finden ist (49). Hiernach ist die Bande um 1085 cm^{-1} in Uebereinstimmung mit der Literatur (53) der symmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung zuzuordnen.

Ebenfalls erwartet werden mehrere Riboseschwingungen, die auch im Spektrum der monomeren D-Ribose zu beobachten sind (Abb. 11). In DNS findet man in der H- und D-Form eine Bande bei 1055 cm^{-1} und eine bei 1020 cm^{-1} (4), in RNS und den Polyribonukleotiden eine breite Schulter im Bereich 1065 - 1070 cm^{-1}, die beim Deuterieren verschwindet, während eine Bande im Bereich 1050 - 1000 cm^{-1} auftaucht. Letztere wird bei den verschiedenen Substanzen mehr oder minder stark aus dem Bandenkomplex herausgeschoben. Sie ist der In-plane-Deformationsschwingung der 2'OD Gruppe zugeordnet (47). Wie bereits diskutiert (siehe S. 38) handelt es sich jedoch bei dieser Schwingung um keine reine Deformationsschwingung.

Die Intensität der Schulter bei 1070 cm^{-1} ist bei den einzelnen Salzen der hier betrachteten Polynukleotide etwas unterschiedlich. Den Charakter einer scharfen Bande, die allerdings beim Trocknen wieder zu einer Schulter verkümmert, nimmt sie nur bei K^+ Poly C und in der protonierten Form des Poly A an. Das sind Symptome, die erkennen lassen, daß die absorbierende Gruppe durch die Sekundärstruktur beeinflußt wird. Es muß sich um die antisymmetrische Valenzschwingung der C-O-C Aether-Gruppierung in der Ribose handeln, denn auch Tetrahydrofuran absorbiert bei 1076 cm^{-1}, und beim Diäthyläther wird die antisymmetrische C-O-C Valenzschwingung bei 1062 cm^{-1}, die entsprechende symmetrische Schwingung bei 1120 cm^{-1} beobachtet (49). Die Zu-

ordnung zur C-O-(P) Valenzschwingung (4) der Estergruppierungen konnte nicht übernommen werden, da auch Adenosin, Cytidin und Uridin um 1070 cm^{-1} absorbieren, die Ribose aber in diesen Verbindungen nicht verestert ist.

Wie im folgenden noch ausführlich diskutiert wird, beruht die bisweilen beobachtete Verschiebung dieser Bande beim Deuterieren auf einer Kopplung mit der In-plane-Deformationsschwingung der 2'OD Gruppe (Kap. 5.0).

An der Flanke der symmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung nach höheren Wellenzahlen hin befindet sich in allen Ribopolynukleotiden eine mehr oder minder gut ausgeprägte Bande um 1130 cm^{-1}. Tsuboi et al. (55) fanden diese Bande in einem orientierten Poly A Film im polarisierten IR-Licht aus zwei Komponenten zusammengesetzt, die senkrecht zueinander stehen. Da sie in Desoxyribopolynukleotiden fehlt, ordneten sie diese Bande der antisymmetrischen Valenzschwingung der $\begin{matrix} C> \\ C> \end{matrix}$C-O Gruppierung der Ribose um die 2'OH Gruppe zu. Im Spektrum von Isopropanol, Isopropylamin und der D-Ribose (Abb. 11) wird diese Schwingung ebenfalls gefunden. In Kap. 7.4 wird über die Beeinflussung dieser Bande durch verschiedene Ionen berichtet.

Abb. 9 und 10 (siehe S. 44 und 45):

IR-Spektren von Salzen des Poly A, Poly C und Poly U

links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
rechts:scharf getrocknet

Abb. 9: Li^+———, Na^+-----, K^+-.-.-, Cs^+·····

Abb. 10: Mg^{2+}———, Ca^{2+}-----, Ba^{2+}-.-.-, Cs^+·····

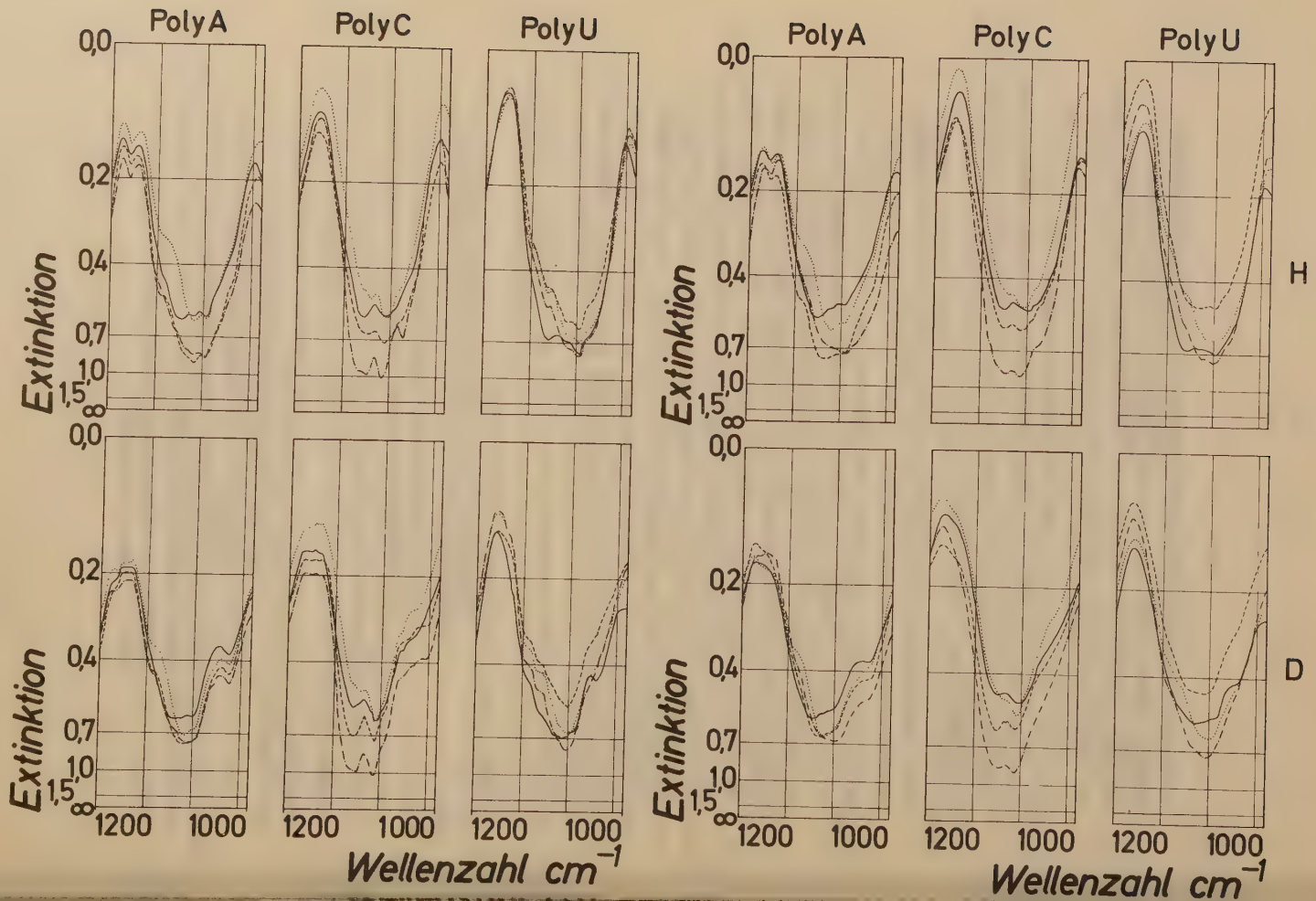
Abb. 11a und 11b (siehe S. 46 und 47):

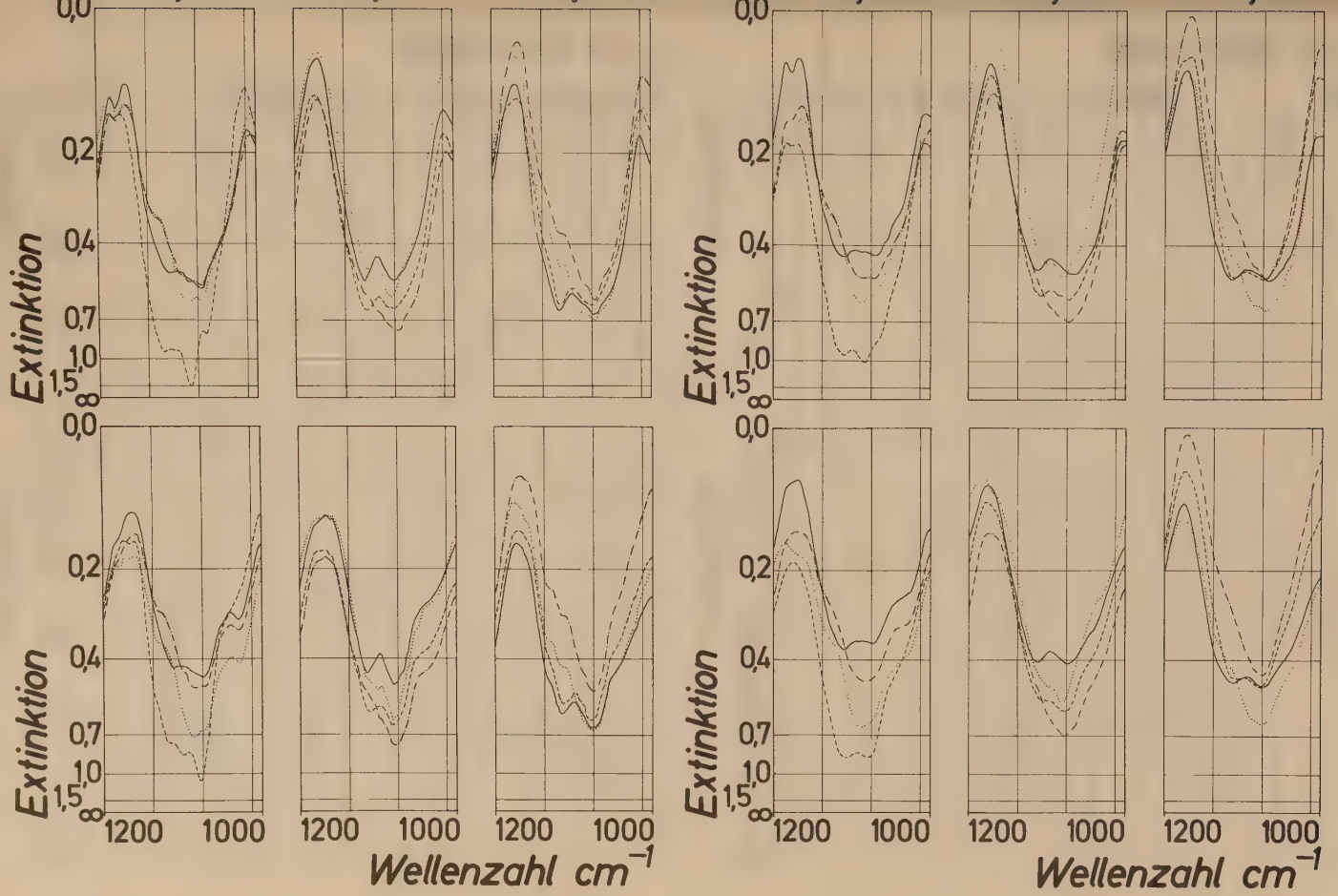
IR-Spektren monomerer Ribosen

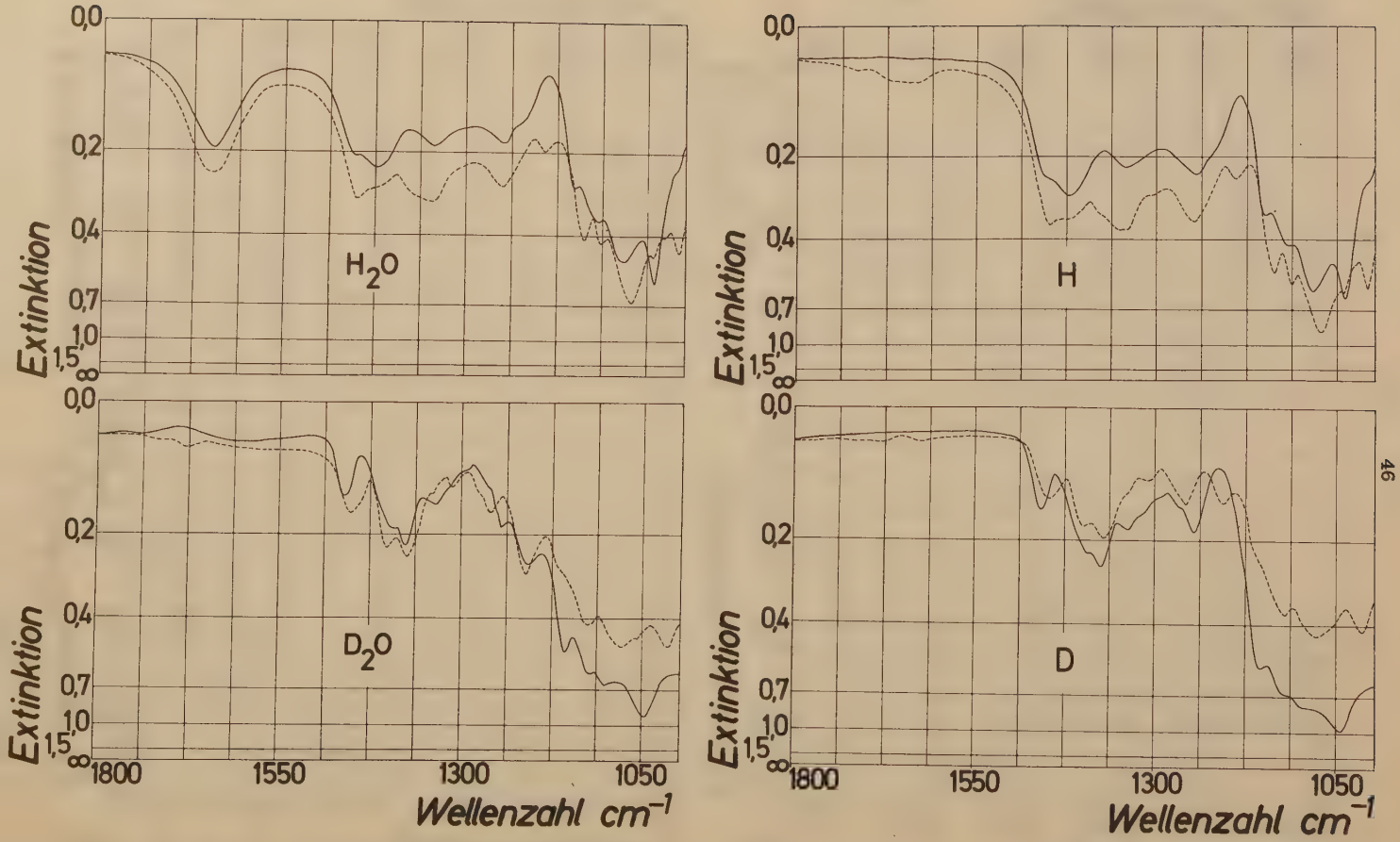
D-Ribose ———, D-desoxy-Ribose -----

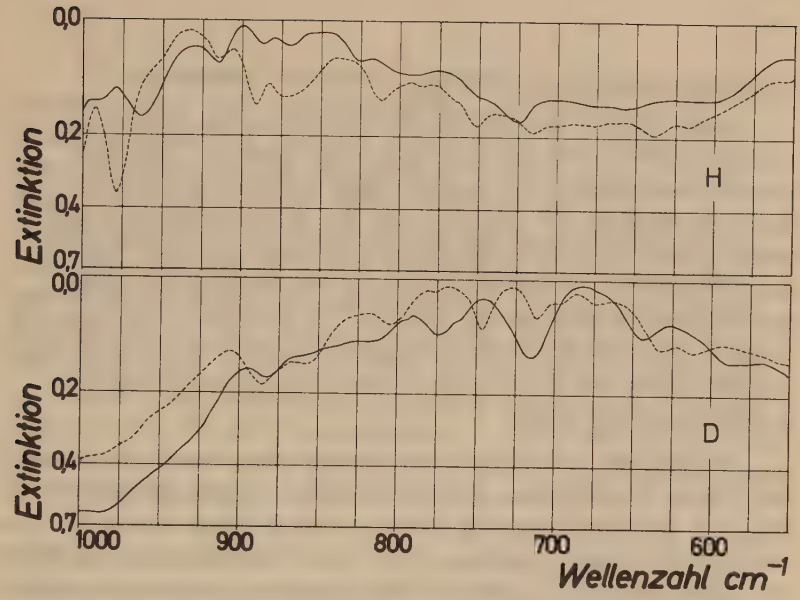
Abb. 11a: links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
rechts:scharf getrocknet

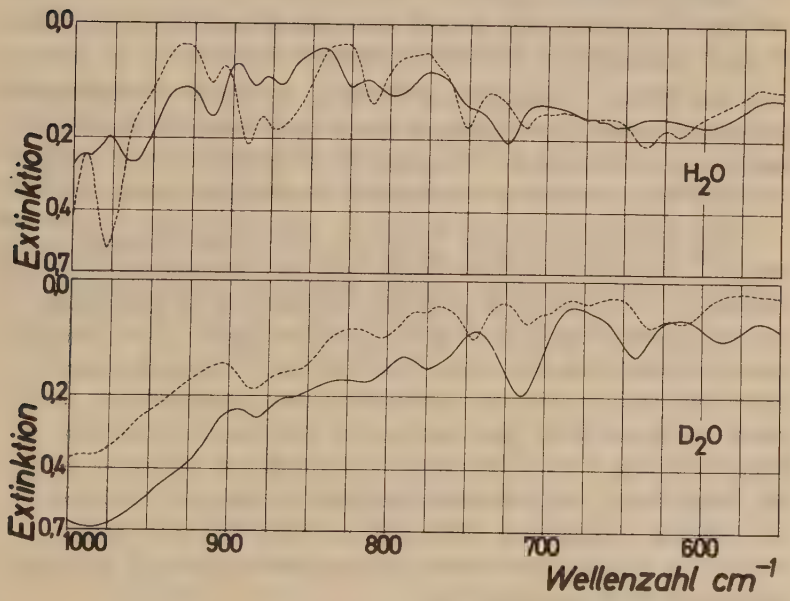
Abb. 11b: unten: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
oben: scharf getrocknet


Poly A
Poly C
Poly U
Poly A
Poly C
Poly U
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H
D
1200
1000
Wellenzahl cm⁻¹


0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H
D
1200
1000
Wellenzahl cm⁻¹


0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H2O
H
D2O
D
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm−1


0,0
0,2
0,4
0,7
Extinktion
H
D
1000
900
800
700
600
Wellenzahl cm⁻¹


0,0
0,2
0,4
0,7
Extinktion
H2O
D2O
1000
900
800
700
600
Wellenzahl cm⁻¹

4.6 Der Bereich 1000 - 550 cm^{-1} (Abb. 12, 13 und 14)

Ueber diesen Bereich findet man nur wenig Literatur. Von den Banden, die man hier antrifft, sind die meisten schwach ausgeprägt, nur wenige haben mittlere Intensität. Hier absorbieren nur Schwingungen von Einfachbindungen und Out-of-plane-Deformationsschwingungen. Man erwartet die symmetrische und antisymmetrische O-P-O Valenzschwingung der Phosphodiesterbindung, C-C und C-O Valenzschwingungen von Gruppierungen an der Ribose, wagging Schwingungen der CH Gruppen der Basen und der Ribose, sowie Out-of-plane-Skelett-Schwingungen der Basen.

Allen drei Polynukleotiden ist ein Bandenpaar um 995 cm^{-1} und 965 cm^{-1} gemeinsam. Die Intensitäten dieser Banden nehmen nach dem H-D-Austausch stark ab, es bleiben nur noch schwache Schultern sichtbar (Abb. 12, 13 und 14). Das Spektrum der Ribose zeigt an dieser Stelle ebenfalls zwei Banden, die sich auch so verhalten. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich auch hier um Riboseschwingungen handelt.

Bei 936 cm^{-1} erkennt man in allen Spektren der H_2O hydratisierten Proben eine schwache Bande, die beim Trocknen und nach dem H-D-Austausch verschwindet. Dieses Verhalten könnte auf eine OH Out-of-plane-Deformationsschwingung hinweisen.

Bei den verschiedenen Arten der RNS liegt zwischen 920 cm^{-1} und 910 cm^{-1} eine Bande, die man bei der DNS nicht findet (4). Bei den drei hier untersuchten Polynukleotiden ist in diesem Bereich auch eine schwache Bande zu beobachten, ebenso im Spektrum der Ribose bei 914 cm^{-1}. Erstaunlicherweise gewinnt sie bei der Ausbildung von Doppelhelices sehr stark an Intensität. Dies ist sowohl bei der Bildung von Poly (A+U) aus Poly A und Poly U zu sehen (4) wie auch bei der Doppelhelix des protonierten Poly A (Abb. 29) und der Ca^{2+} Poly A Doppelhelix (Abb. 39). Das K^{+} Salz des Poly C bildet die einzige Ausnahme, wo diese Bande auch in der einsträngigen Form intensiv ist.

Ein Bandenpaar um 882 cm^{-1} und 863 cm^{-1} zeigt eine gewisse Ionen- und Strukturabhängigkeit. Von Lubos (4) wurde die Bande bei 860 cm^{-1} daher der antisymmetrischen O-P-O Valenzschwingung zugeordnet. Diese Zuordnung kann nicht übernommen werden. Thomas (56) beobachtete im Laser-Ramanspektrum bei der Untersuchung von wäßriger RNS-Lösung eine Bande bei 814 cm^{-1}, die bei Erhöhung der Ionenstärke sehr intensiv wurde. Er schrieb diesen Effekt einer Konformationsänderung der Phosphatgruppe zu. Er beruft sich dabei auf Shimanouchi und Tsuboi (47), die Bariumdiäthylphosphat im kristallinen Zustand und in Lösung untersuchten und die auftretenden Intensitätsänderungen so deuteten. Für die antisymmetrische O-P-O Valenzschwingung gaben sie die Bandenlage bei 814 cm^{-1} und für die symmetrische Schwingung bei 750 cm^{-1} an. In dieser Gegend adsorbieren auch alle drei hier untersuchten Polynukleotide (Tab. 6), unabhängig davon, ob die Probe H_2O- oder D_2O-hydratisiert ist. Eine deutliche Aufspaltung der antisymmetrischen Schwingung um 820 cm^{-1} ist nur bei Li^+ Poly U im Spektrum der D_2O-hydratisierten Probe zu beobachten (Abb. 14). Dasselbe Salz stellt auch durch die Aufspaltung der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Bande (Abb. 7) einen Sonderfall dar. Obwohl dafür keine Erklärung gefunden wurde, erhärtet dieser Befund phänomenologisch die hier getroffene Zuordnung. Auf Grund ihrer Ionenempfindlichkeit könnte die Bande um 860 cm^{-1} der symmetrischen Valenzschwingung der $\begin{matrix} C \\ C \end{matrix}\!>\!C\text{-}O$ Gruppierung zugeordnet werden, deren antisymmetrische Schwingung um 1130 cm^{-1} zu finden ist (Kap. 4.5).

Poly A	Poly C	Poly U	
995 -	995 -	996 -	Riboseschwingung
965 (958)	966 (956)	963 (958)	Riboseschwingung
936 -	935 -	935 -	Out-of-plane-Schwingung der 2'OH Gruppe (?)
913 (913)	914 (910)	912 (912)	Riboseschwingung
882 (880)	883 (878)	882 (881)	
866 (865)	863 (867)	866 (866)	symmetrische Valenzschw. der $\begin{matrix} C \\ C \end{matrix}\!>\!C\text{-}O$ Gruppierung der Ribose (antisymmetrische Schwingung 1130 cm^{-1})
825 (822)	829 (829)	823 (829)	
796 (795)	809 (807)	817 (816)	antisymmetrische O-P-O Valenzschwingung
785 (782)	788 (785)	777 (776)	Out-of-plane-Schwingung der Basen (?)
768 (760)	755 (748)	765 (769)	symmetrische O-P-O Valenzschwingung
724 (715)	(720)	722 (725)	Riboseschwingung
703 (699)	710 (703)	- (700)	
- (674)	- (668)	668 (667)	
648 (648)		645 (641)	
	630 (629)	627 -	
	597 (598)		
		617 (616)	

Tabelle 6: Bandenlagen (in cm^{-1}) im Bereich unterhalb 1000 cm^{-1} bei 75% rel. Luftfeuchtigkeit H_2O (D_2O)

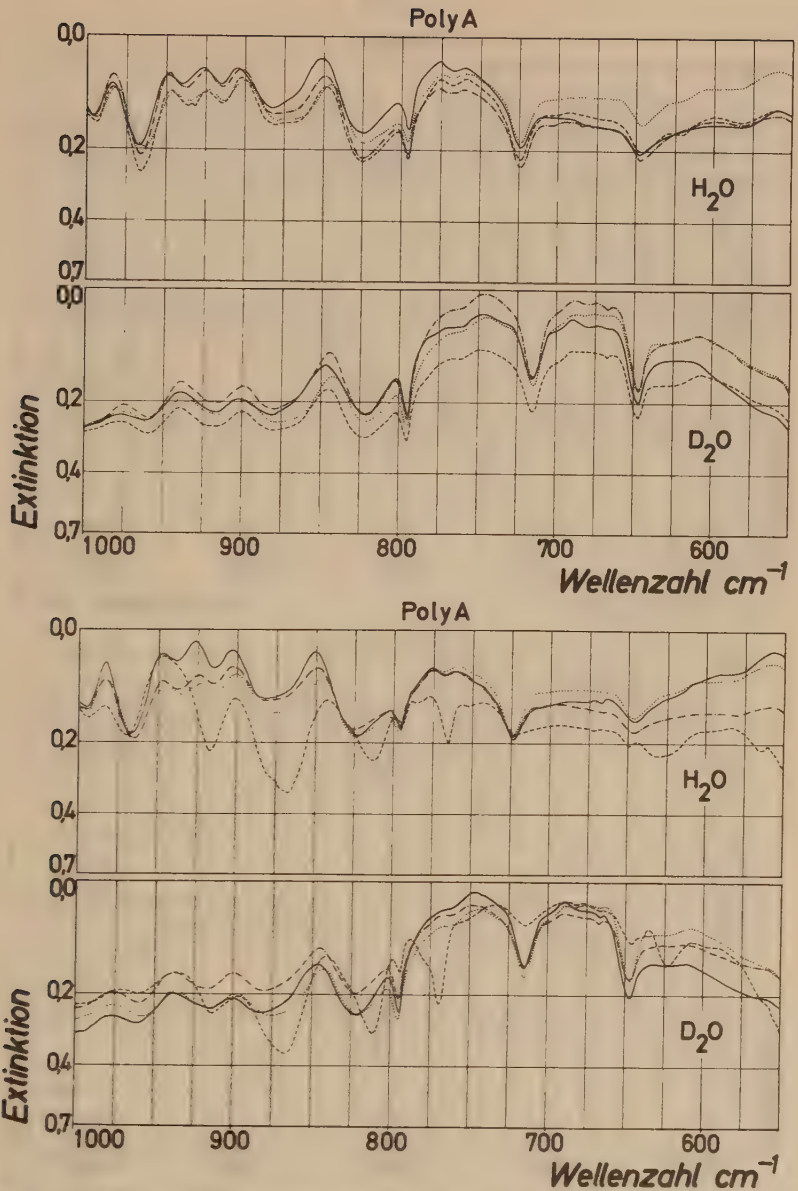


Abb. 12: IR-Spektren von Salzen des Poly A bei 75% relativer Luftfeuchtigkeit
oben: Li^+ ———, Na^+ -----, K^+ -.-.-, Cs^+ .....
unten: Mg^{2+} ———, Ca^{2+} -----, Ba^{2+} -.-.-, Cs^+ .....

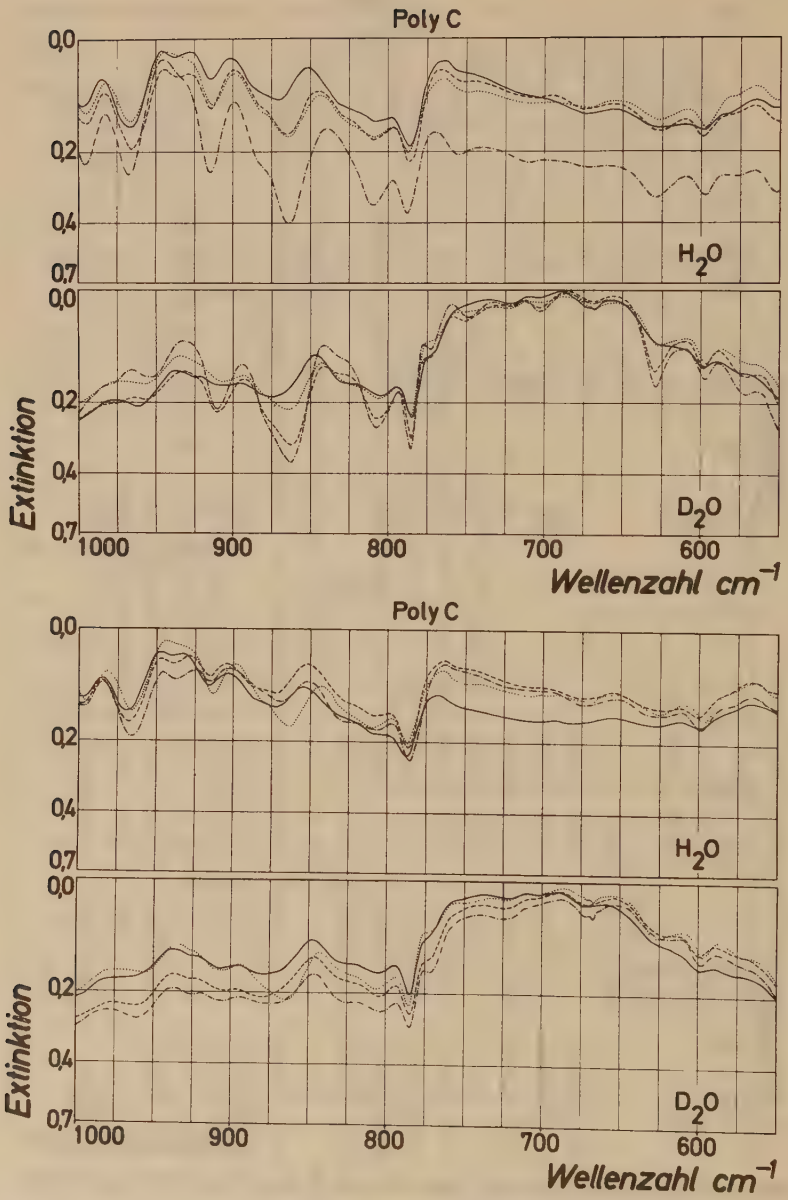


Abb. 13: IR-Spektren von Salzen des Poly C bei 75% relativer Luftfeuchtigkeit
oben: Li^+ ———, Na^+ -----, K^+ _.-.-, Cs^+ .....
unten: Mg^{2+} ———, Ca^{2+} -----, Ba^{2+} -.-.-, Cs^+ .....

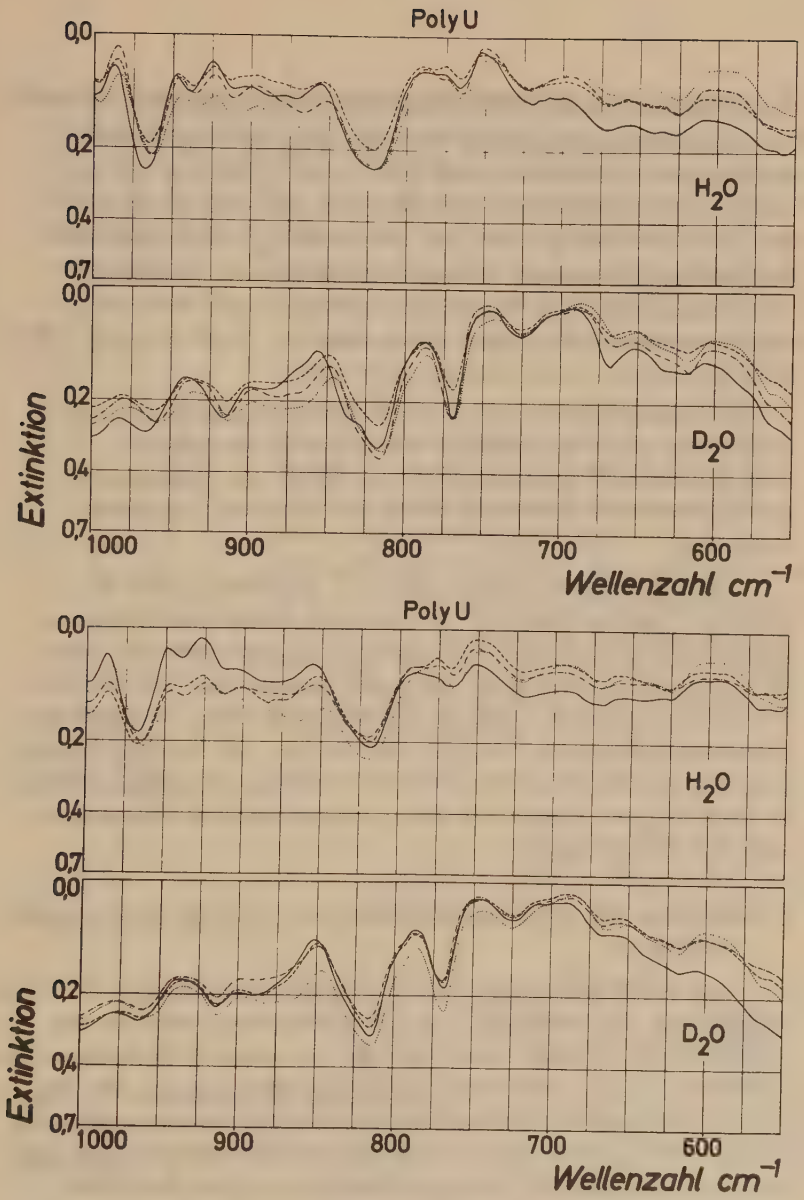


Abb. 14: IR-Spektren von Salzen des Poly U bei 75% relativer Luftfeuchtigkeit
oben: Li^+ ———, Na^+ -----, K^+ -.-.-, Cs^+ .....
unten: Mg^{2+} ———, Ca^{2+} -----, Ba^{2+} -.-.-, Cs^+ .....

5.0 Kopplung von Schwingungen der Gruppierungen des Rückgrats

Detaillierte Aussagen über die Basenpaarung machen Schwingungen im Bereich 1800 - 1500 cm^{-1}, wie aus der Diskussion der Doppelhelices hervorgeht, die sich in saurem Milieu bilden (Kap. 8.0). Bei neutralem p_H sind keine entsprechenden Kopplungen dieser Schwingungen zu beobachten, was zeigt, daß unter diesen Bedingungen keine doppelhelikalen Strukturen vorliegen. Eine Ausnahme macht das Ca^{2+} Poly A (Kap. 9).

Aussagen über Strukturen des Rückgrats kann man aus Kopplungen von Schwingungen, deren Banden im Bereich 1300 - 1000 cm^{-1} liegen, erhalten. Ueber die Konformation des Riboserestes gibt eine Bande bei 1130 cm^{-1} Auskunft (Kap. 7.4).

In dem Bereich 1300 - 1000 cm^{-1} beobachtet man um 1240 cm^{-1} und um 1050 cm^{-1} jeweils ein Bandenpaar, das von koppelnden Schwingungen verursacht wird. Um 1240 cm^{-1} koppelt die antisymmetrische Valenzschwingung der $>PO_2^-$ Gruppe mit einer Schwingung, die im wesentlichen eine In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe ist. Um 1050 cm^{-1} koppeln die antisymmetrische Valenzschwingung der C-O-C Aethergruppierung der Ribose und die In-plane-Deformationsschwingung der 2'OD Gruppe.

5.1 Kopplung der Aether-Schwingung mit der 2'OD Deformationsschwingung

Die antisymmetrische C-O-C Valenzschwingung hat ihr Uebergangsmoment auf der C(1') - C(4') Verbindungslinie in der Ringebene des Riboseringes, das der In-plane 2'OD Deformationsschwingung liegt senkrecht zur OD Valenzachse. Die für das Poly A postulierte Struktur zeigt, daß die Uebergangsmomente beider Schwingungen parallel gerichtet sein können (Abb. 25). Voraussetzung hierfür ist, daß die 2'OD Gruppe über eine Wasserstoffbrücke an die Aether-Gruppe des benachbarten Ribose-

ringes gebunden ist. Diese Bindung führt zu einer Strukturierung des Rückgrats in der die 2'OD Gruppe räumlich fixiert ist. Hierbei stehen die Uebergangsmomente der beiden Schwingungen parallel. Abb. 15 zeigt ein typisches Beispiel bei dem in der D Form eine derartige Kopplung eintritt.

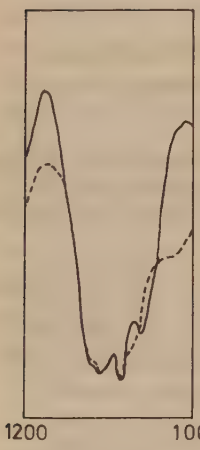


Abb. 15: K^+ Salz des Poly C
—— H Form
---- D Form

Aus dem Bau von Molekülmodellen geht - wie im folgenden noch dargelegt wird - hervor, daß bei der Verknüpfung mit jeder anderen Gruppe die Orientierung der 2'OH Gruppe im Raum so festgelegt wird, daß das Uebergangsmoment ihrer In-plane-Deformationsschwingung nicht parallel zum Uebergangsmoment der antisymmetrischen C-O-C Valenzschwingung ist. Dies gilt sowohl für die des zugehörigen wie auch für die des benachbarten Riboseringes. Somit beweist die beobachtete Kopplung die Verknüpfung der 2'OH Gruppe mit dem benachbarten Riboserest über eine Wasserstoffbrücke, wie dies Abb. 16 zeigt.

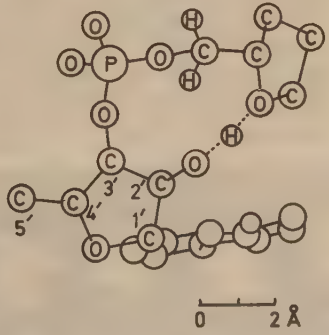


Abb. 16: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücke, die benachbarte Ribosegruppen verknüpft

Eine derartige Verknüpfung der Ribosen untereinander stellten Shugar und Zmudzka in ihrer UV-Arbeit über die Rolle der 2'OH Gruppe für die Struktur des Mg^{2+} Poly U bei tiefen Temperaturen zur Diskussion (33) (69). Mit ihrer Methode konnten sie allerdings keinen Beweis für eine solche Bindung erbringen.

An Hand dieser Kopplung wird in Kap. 5.0 untersucht, unter welchen Bedingungen die Ribosereste im Rückgrat in dieser Weise miteinander verknüpft sind.

Ueber die Art der von der 2'OH Gruppe ausgehenden Wasserstoffbrücke wurden in der Literatur schon verschiedene Vorschläge gemacht. Es soll im folgenden gezeigt werden, daß diese mit den IR-Befunden nicht vereinbar sind.

Eine Brücke zu Akzeptorgruppen an den Baseresten, wie sie Ts'o postulierte (57), liegt nicht vor, da das Uebergangsmoment der Deformationsschwingung nicht in der für die beobachtete Kopplung erforderlichen Weise zur Schwingung der Aethergruppierung orientiert ist. Außerdem würden derartige Wasserstoffbrücken nicht die Starrheit des Zucker-Phosphat-Skeletts erklären, die sich bei der Untersuchung mit der Röntgenkleinwinkelstreuung (23) zeigt (vgl. S. 21).

Eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH Gruppe und dem O(3) der Phosphatgruppe postulieren Arnott et al. (58) aus Röntgendaten bei kristallisierter RNS. Doch dort handelt es sich um eine Doppelhelix, die auf diese Weise in der Faser mit einer zweiten daneben angeordneten Doppelhelix verknüpft ist.

Eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen diesen beiden Gruppen ist kaum denkbar. Die Wasserstoffbrücke wäre mit etwa 90° viel zu stark abgewinkelt (Abb. 17). Diese Art der Verknüpfung wird auch der Steifheit des Rückgrats nicht gerecht, da weiterhin freie Drehbarkeit um die Phosphoesterbindung, die zum C(5') führt, möglich ist.

Abb. 17: Eine Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH Gruppe und der Phosphatgruppe wäre zu stark abgewinkelt

5.2 Kopplung der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Schwingung mit der 2'OH Deformationsschwingung

Auch die Kopplung der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung mit der Schwingung, die im wesentlichen eine In-plane-2'OH-Deformationsschwingung ist, macht wichtige Aussagen über die Struktur des Rückgrats. Man beobachtet diese Aufspaltung nicht bei allen Salzen der Ribo-Homonukleotide. Es muß zwei verschiedene Konformationen des Rückgrats geben, eine, bei der diese Uebergangsmomente parallel sind, und eine, bei der sie senkrecht aufeinander stehen.

Das Uebergangsmoment der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung ist parallel zu der O··O Verbindungslinie der nicht Ester-gebundenen Sauerstoffatome, das der symmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung fällt mit der Winkelhalbierenden des OPO-Winkels zusammen, steht also senkrecht zu dem der antisymmetrischen Schwingung.

Das Uebergangsmoment der In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe liegt in der Ebene des Furylringes, senkrecht zur OH Valenzachse (59), wenn die Ribosen miteinander verknüpft sind.

Durch die diskutierte Verbrückung der Ribosegruppen ist das Uebergangsmoment der 2'OH Deformationsschwingung im Raum festgelegt. Ist die $>PO_2^-$ Gruppe am Rückgrat nach außen gekehrt (Abb. 18), so stehen die Uebergangsmomente der 2'OH Deformationsschwingung und der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung senkrecht, es gibt keine Aufspaltung.

Nun kann man aber die $-CH_2-$ Gruppe in 5'Stellung der Ribose und die Phosphatgruppe um ihre Diesterbindung gegeneinander verdrehen. Dabei kehrt sich die $-CH_2-$ Gruppe in dem Maße stärker nach außen, wie sich die Phosphatgruppe der Base zukehrt. Am Kalottenmodell (Abb. 19) erkennt man, daß diese Struktur sehr steif ist, was auch die Röntgenkleinwinkelstreuung zeigte (23). Eine derartige Monohelix bildet sich z. B. beim Poly A durch Ionen mit starkem Feld, denn die Kationen können bei dieser

Konformation sowohl mit der $>PO_2^-$ Gruppe, wie auch mit dem π-Elektronensystem der Base wechselwirken. Hierbei werden die Uebergangsmomente der antisymmetrischen Valenzschwingung der Phosphatgruppe und der In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe parallel gerichtet, und beide Schwingungen koppeln (siehe Abb. 9 und 10). Man muß, wie bisweilen beobachtet, eine Doublettstruktur finden.

Abb. 18: Die $>PO_2^-$ Gruppen sind von den Basen weggedreht

Abb. 19: Monohelix in der die $>PO_2^-$ Gruppen den Basen zugekehrt sind

Eine ähnliche Aufspaltung beobachteten Tsuboi et al. (59) (60) bei der Untersuchung doppelhelikaler Reiszwergvirus-RNS. Diese Autoren konnten die Makromoleküle im Film ausrichten und führten die Untersuchung mit polarisierter IR-Strahlung durch. Sie stellten dabei fest, daß die Bande um 1240 cm^{-1} in zwei Komponenten aufspaltet, von denen die eine bevorzugt dann erscheint, wenn die Polarisationsebene

parallel zur Helixachse liegt, die andere aber bevorzugt senkrecht zur Helixachse orientiert ist. Genau wie bei der vorliegenden Untersuchung verschwindet die Aufspaltung beim H-D-Austausch, ein Resultat, das diese Autoren bei ihrer Deutung nicht berücksichtigten. Sie nehmen nämlich an, daß diese Aufspaltung von einer Kopplung zwischen allen Phosphatgruppen des Rückgrats herrührt.

Nach der Theorie von Miazawa (61) (62) (63) ist unter diesen Bedingungen eine zur Helixachse parallele und eine zur Helixachse senkrechte Schwingung zu erwarten. Es stellt sich nun die Frage, wie diese Deutung mit dem Sachverhalt, daß die Kopplung bei H-D-Austausch verschwindet, vereinbar ist.

Auch im Falle der DNS wird eine Aufspaltung beobachtet. Sie ist jedoch so geringfügig, daß sie sich nur in einer kleinen Verschiebung der Bande der antisymmetrischen Phosphatschwingung bemerkbar macht, wenn man senkrecht oder parallel zur Helixachse orientiertes IR-Licht einstrahlt.

Folgende Erklärung ist mit beiden Gesichtspunkten vereinbar: Wie diskutiert koppelt die antisymmetrische $>PO_2^-$ Schwingung mit der In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe, wenn die Uebergangsmomente beider Schwingungen parallel gerichtet sind. Ist dies der Fall, so sind in den postulierten monohelikalen Strukturen (Abb. 18 und Abb. 19) auch die Uebergangsmomente der betreffenden Schwingungen aller Phosphatgruppen annähernd parallel, was wie bei der DNS zu einer minimalen zusätzlichen Aufspaltung führt und bewirkt, daß die eine Komponente längs und die andere senkrecht zur Helixachse ausgerichtet ist.

6.0 Veränderungen an der Riboseschwingung bei 1130 cm^{-1}

Bei Ribo-Polynukleotiden beobachtet man bei 1130 cm^{-1} eine Bande, die Tsuboi einer antisymmetrischen Skelettschwingung der Ribose zuordnete (64). Es handelt sich um eine entartete Schwingung der Gruppierung $\begin{matrix} C \\ C \end{matrix}$>C-O. Die Intensität dieser Bande ist außerordentlich empfindlich abhängig von der Art der anwesenden Kationen, was in Kap. 7.4 gezeigt wird. Entsprechende ionenabhängige Veränderungen wurden früher bei r.RNS beobachtet (4).

Diese Absorptionsänderungen müssen auf Aenderungen der Konformation des Riboseringes zurückzuführen sein. Es ist bekannt, daß der Ribosering in verschiedenen Konformationen vorliegen kann (65) (66), bevorzugt sollen die beiden Konformationen 2'endo und 3'endo (67) auftreten, wobei jeweils das 2'C bzw. 3'C über die Ebene, die die anderen Atome des 5-Ringes bilden, nach oben herausragt. Die Frage, welche Konformation zu einer intensiveren Bande und welche zu einer weniger intensiven Bande führt, konnte leider bisher nicht entschieden werden. In Kap. 7.4 können daher nur die Bedingungen, die die Intensität beeinflussen, genannt werden.

7.0 Die Struktur des Rückgrats

7.1 Die Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH Gruppe und dem Aethersauerstoff

Im folgenden sei zunächst die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen der 2'OH Gruppe und der Aethergruppierung der benachbarten Ribose betrachtet. Man kann diese in Abhängigkeit von der Art der Basenreste in Abb. 9 und 10 an Hand der Kopplung zwischen der C-O-C Skelettschwingung und der OD Deformationsschwingung im Bereich 1080 - 1000 cm^{-1} verfolgen.

Die 2'OD Deformationsschwingung ist durch diese Kopplung beim Poly A weitaus am kräftigsten nach kleineren Wellenzahlen verschoben; das bedeutet, daß diese Wasserstoffbrücke bei allen Salzen des Poly A gut ausgebildet ist, wodurch sich das Rückgrat versteift (Abb. 20). Eine Ausnahme bildet lediglich das Ca^{2+} Salz, bei dem eine völlig andere Struktur vorliegt (Kap. 9.0).

Die von Melcher (68) im NMR-Spektrum gemachte Beobachtung, daß der 2'H Wasserstoff mit dem π-Elektronensystem der Basen der RNS in Wechselwirkung treten kann, stimmt mit dieser Struktur gut überein. Die Abbildung zeigt, daß die 2'H Gruppe direkt in das aromatische π-Elektronensystem eintaucht.

Beim Poly C ist die 2'OD Deformationsschwingung nur noch als Schulter zu erkennen. Die Tendenz für die Ausbildung der Wasserstoffbrücke hat danach vom Poly A zum Poly C hin abgenommen.

Beim Poly U ist diese Schulter meist noch schwächer, jedoch beim Mg^{2+} Salz noch deutlich zu erkennen. Das Li^{+} Salz bildet eine Ausnahme, bei ihm findet man - ähnlich wie bei Poly A - eine Bande. Daraus kann man schließen, daß die Wasserstoffbrücke beim Poly U oft nicht ausgebildet ist und daß bei den meisten Salzen des Poly U die Stabilisierung des

Rückgrats durch diese Brücke nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Dieser Gang zeigt ein Wechselspiel zwischen dem stacking Effekt der Basen und der Ausbildung der Wasserstoffbrücken am Rückgrat an. Vom Poly A über das Poly C zum Poly U nimmt der aromatische Charakter und die Polarisierbarkeit der Basen und damit auch der stacking Effekt ab (67). Das Stapeln der Basen wirkt sich strukturstabilisierend auch auf das Rückgrat aus und begünstigt die Ausbildung der Wasserstoffbrücke, die ihrerseits zu einer weiteren Stabilisierung führt. In den Spektren der getrockneten Proben ist zu erkennen, daß die kopplungsverursachende Aufspaltung meist weitgehend verschwunden ist, was den Zusammenbruch der Struktur anzeigt.

Beim Poly A ist, sieht man vom Ca^{2+} Salz ab, die Ausbildung der Wasserstoffbrücke unabhängig von der Art des anwesenden Kations. Beim Poly C ist sie bei Anwesenheit von Na^{+} und K^{+} gegenüber den anderen Ionen etwas begünstigt. Bei diesen Ionen sind auch die Ribosebanden bei 1130 cm^{-1}, 1056 cm^{-1} und bei 863 cm^{-1} wesentlich intensiver und schärfer. Dies zeigt eine Besonderheit an und steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die man sonst bei einwertigen Ionen macht (siehe auch Tab. 8).

Beim Poly U wird beim Li Salz die Wasserstoffbrücke ausgebildet, beim Mg Salz auch noch, aber undefinierter (siehe S. 64) und bei Ionen mit schwächerem Feld zunehmend nicht mehr.

7.2 Die Orientierung der Phosphatgruppe am Rückgrat

In Kap. 7.1 wurde gezeigt, daß die Aufspaltung der Phosphatbande bei 1240 cm^{-1} die Kopplung mit der 2'OH Deformationsschwingung anzeigt. Ist die Bande nicht aufgespalten, so ist die $>PO_2^-$ Gruppe am Rückgrat nach außen gekehrt, während die Aufspaltung anzeigt, daß die $>PO_2^-$ Gruppe so den Basen zugekehrt ist, daß das Kation gleichzeitig mit der Phosphatgruppe und dem π-Elektronensystem der Basen in Wechselwirkung treten kann. Sind die Phosphatgruppen auf die Basen ausgerichtet, so wird

das Rückgrat schraubenförmig verdrillt, es bildet sich eine recht steife Monohelix aus.

Abb. 20: Monohelix

In Abb. 8 erkennt man, daß beim Poly A die Bande bei 1240 cm^{-1} bei Anwesenheit von zweiwertigen Ionen stets aufgespalten ist, während die Aufspaltung bei Anwesenheit von einwertigen Ionen vom Li^+ zum Cs^+, d. h. mit abnehmendem Kationenfeld verschwindet (Abb. 7).

Beim Poly C findet man die Aufspaltung bei keinem der untersuchten Salze, das bedeutet, daß die $>PO_2^-$ Gruppe stets nach außen gekehrt ist.

Der Vergleich der Bandenlagen bei Anwesenheit zweiwertiger Ionen am Poly A und Poly C zeigt sehr schön, wie beim Poly A die beiden Banden durch die Kopplung auseinanderwandern.

	Poly A		Poly C	
Mg:	1242	1224 (1236)	1230	(1233)
Ca:	1242	1222 (1235)	1230	(1235)
Ba:	1241	1227 (1236)	1229	(1235)

Tabelle 7: Bandenlage (in cm^{-1}) der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Schwingung H_2O (D_2O)

Beim Poly U findet man die Doublettstruktur nur beim Mg^{2+} Salz, d. h. nur Mg^{2+} Ionen induzieren die Konformation, bei der die $>PO_2^-$ Gruppe der Base zugekehrt ist.

Im Spektrum des D_2O hydratisierten Li^+ Poly U (Abb.7) spaltet sich die Bande der antisymmetrischen $>PO_2$ Schwingung in zwei Komponenten auf. Diese liegen bei 1245 cm^{-1} und bei 1217 cm^{-1}. Bei keinem anderen Salz eines der untersuchten Polynukleotide ist eine solche Aufspaltung zu beobachten. Der starke Intensitätsverlust beider Komponenten beim Trocknen weist darauf hin, daß sie auf eine Besonderheit der Struktur, die nicht geklärt werden konnte, zurückzuführen ist. Ein ähnliches Verhalten beobachtet man an der Bande der antisymmetrischen O-P-O Valenzschwingung um 820 cm^{-1} nur beim Li^+ Poly U (Abb. 14).

7.3 Die Sekundärstruktur des Mg^{2+} Poly U

Zmudzka und Shugar (32) (33) untersuchten Mg^{2+} und K^+ Salzlösungen des Poly U in Abhängigkeit von der Temperatur; entsprechende Untersuchungen führten sie auch mit 2'O methyliertem Poly U durch. Beim K^+ Salz fanden sie mit abnehmender Temperatur unterhalb von 10°C nur geringfügige Hypochromizität, während beim Mg^{2+} Salz um 5°C eine außerordentlich kooperative Konformationsumwandlung eintritt. Demgegenüber bildet das methylierte Poly U eine Sekundärstruktur, die trotz wesentlich geringerer Kooperativität viel stabiler ist, denn der Schmelzvorgang findet bei ca. 25°C statt, erstreckt sich aber über einen größeren Temperaturbereich.

Abb. 22 und 23 zeigen Spektren des K^+ Salzes und des Mg^{2+} Salzes bei 40°C und bei 5°C. Was die Kopplung der antisymmetrischen C-O-C Valenzschwingung der Ribose mit der 2'OD Deformationsschwingung angeht, unterscheiden sich die Spektren kaum. Danach kann die Ausbildung der Wasserstoffbrücke der 2'OH Gruppe im Rückgrat für den stark kooperativen Konformationsübergang des Mg^{2+} Salzes nicht die maßgebliche Ursache sein, wie dies Rabczenko et al. (69) in einer eben erschienenen Arbeit vermuten. Außerdem ist diese Kopplung weit undefinierter als beim Poly A, denn man beobachtet keine scharfe Bande der 2'OD Deformationsschwingung, sondern vielmehr eine Verbreiterung, die zeigt, daß die

Wasserstoffbrücken, die die 2'OH Gruppen ausbilden, nicht wie beim Poly A einheitlich kräftig sind.

Auch eine Doppelhelix kann beim Mg^{2+} Salz nicht der Grund für den kooperativen Uebergang sein, denn in einer solchen Struktur haben die beiden C(2)=O Gruppen parallele Uebergangsmomente, sind eng benachbart und erfüllen somit die Kopplungsbedingung (Abb. 21). Dies müßte zu einer Aufspaltung der Bande bei 1698 cm^{-1} führen. Die Folgen einer solchen Kopplung wurden von Howard, Frazier und Miles (70) im Falle des GC-Paares ausführlich untersucht und diskutiert. Hier jedoch beobachtet man an der entsprechenden Bande beim Abkühlen keine Veränderungen.

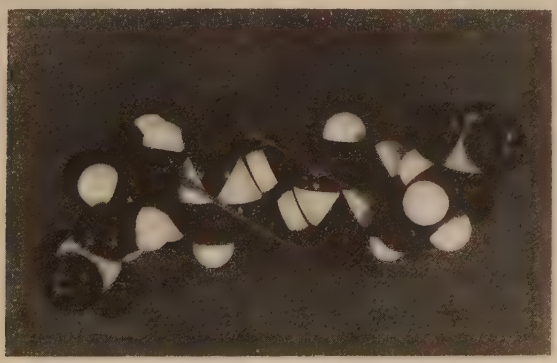
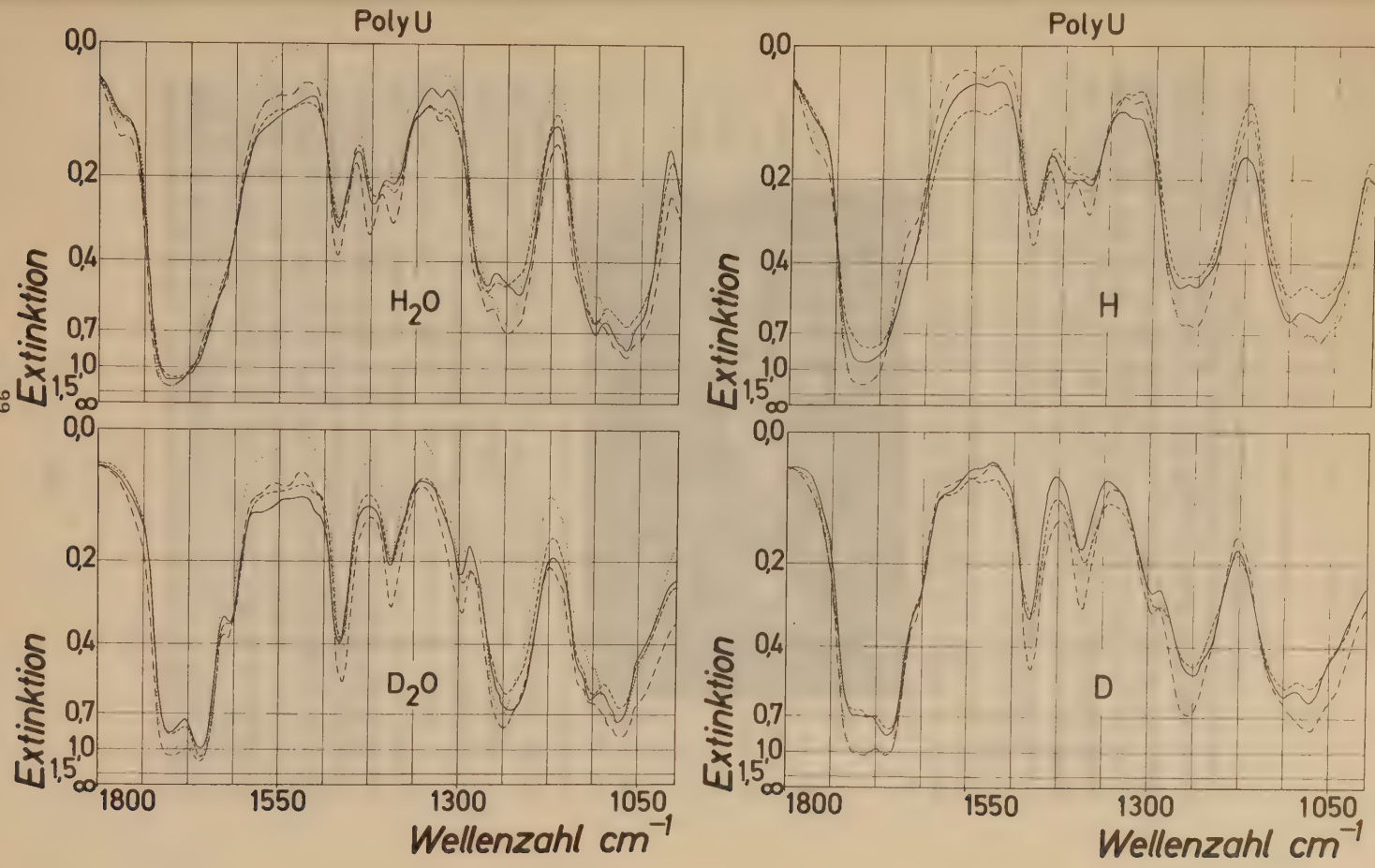
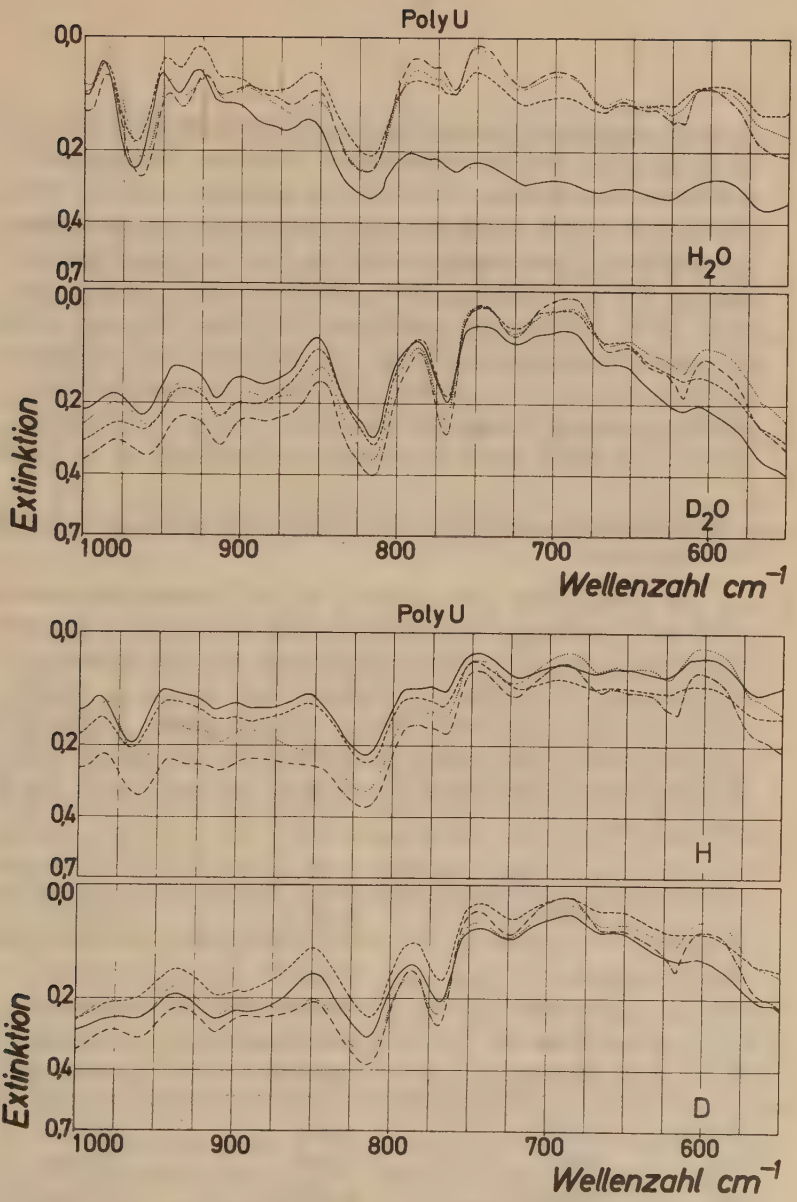


Abb. 21: Modell einer Mg^{2+} Poly U Doppelhelix nach einem Vorschlag von Shugar (70)

Der einzige wesentliche Unterschied in den Spektren tritt an der Bande um 1240 cm^{-1} auf. Die Kopplung zwischen der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Schwingung und der Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe wird so kräftig, wie man es in keinem anderen Fall beobachten konnte. Die niederwellenzahlige Komponente überwiegt, d. h. die Mg^{2+} Ionen drehen die $>PO_2^-$ Gruppen in Richtung auf die Basen und bilden die im Fall des Poly A diskutierte monohelikale Struktur.


Poly U
Poly U
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H_2O
D_2O
H
D
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm^{-1}



IR-Spektren von Salzen des Poly U

Mg^{2+}: ———(5^oC) ----- (40^oC); K^+: -.-.-(5^oC) ·····(40^oC)

S.66 Abb. 22: links: bei 75%rel.Luftfeuchtigkeit,
rechts: scharf getrocknet

S.67 Abb. 23: oben: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit,
unten: scharf getrocknet

Es stellt sich damit die Frage, warum eine solche Struktur einen derart kooperativen Charakter hat. Durch Dialyseuntersuchungen (71) (72) ist bekannt, daß bei zweiwertigen Kationen stets nur ein Ion auf zwei Phosphatgruppen entfällt. Dies bedeutet bei der vorliegenden Struktur, daß nur jeder zweite Basenrest durch ein Mg^{2+} Ion polarisiert wird, während die dazwischenliegenden Basenreste durch die nicht abgeschirmten Felder der Phosphationen in Gegenrichtung polarisiert werden. Dies würde zu einer kräftig stabilisierenden Wechselwirkung längs der Monohelixachse führen, die einen recht kooperativen Charakter haben müßte.

7.4 Abhängigkeit der Ribosekonformation von den verschiedenen Kationen

In Tab. 8 sind die Intensitäten der Riboseschwingung bei 1130 cm^{-1} angegeben. Sie unterscheiden sich stark, was vermuten läßt, daß der Riboserest je nach Art der anwesenden Kationen in verschiedenen Konformationen vorliegt. Ueber deren Art läßt sich bisher keine Aussage machen (siehe S. 60). Allgemein läßt sich jedoch sagen, daß die Intensität der Bande mit zunehmendem Kationenfeld zunimmt. Ausnahmen sind nur K^+ und Na^+ Poly C.

	Poly A	Poly C	Poly U
Li^+	stark	stark	stark
Na^+	schwach	stark	schwach
K^+	schwach	sehr stark	schwach
Cs^+	schwach	schwach	schwach
Mg^{2+}	stark	stark	stark
Ca^{2+}	stark	stark	stark
Ba^{2+}	schwach	schwach	schwach

Tabelle 8: Intensitäten der Riboseschwingungen um 1130 cm^{-1}

8.0 Die Doppelhelices der Ribo-Homopolynukleotide in saurem Milieu

8.1 Die protonierte Poly A Doppelhelix

Von Beers und Steiner (73) wurde in sauren Poly A Lösungen starke Hypochromizität beobachtet. Rich und Davies (17) bauten und diskutierten verschiedene Modelle von Sekundärstrukturen für die protonierte Form des Poly A. Darunter stimmte das einer Doppelhelix mit einer besonderen Art der Basenpaarung (Schema S. 19) am besten mit ihren Röntgenstrukturdaten überein. Aus dem Modell ist nicht ersichtlich, ob die 2'OH Gruppe eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden kann und ihr dadurch eine strukturstabilisierende Aufgabe zukommt.

Die Abb. 27, 28 und 29 zeigen die IR-Spektren des Poly A in Abhängigkeit von der Protonierung, sowohl bei H_2O Hydratation wie auch bei D_2O Hydratation. Den Spektren der D_2O hydratisierten Proben entnimmt man, daß die durch die Kopplung mit der antisymmetrischen C-O-C Valenzschwingung verschobene Bande der 2'OD Deformationsschwingung, die in der neutralen Form sichtbar war (Kap. 7.1), bei 1030 cm^{-1} unverändert auftritt. Sie weist darauf hin, daß auch in der Doppelhelix die Ribosegruppen über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind und daß das so versteifte Rückgrat auch hier die Struktur stabilisiert.

Die Poly-Desoxy-Adenylsäure bildet keine Doppelhelix beim Protonieren aus. Dieser Sachverhalt bestätigt das vorliegende Ergebnis. Wie Abb. 24 zeigt, ist die Behauptung von Riley et al. (74), daß sich kein geeigneter Partner für eine Wasserstoffbrücke mit der 2'OH Gruppe finden läßt, nicht richtig. Dies führte diese Autoren zu dem falschen Ergebnis, daß die Wechselwirkung der 2'OH Gruppe mit dem Lösungsmittel Wasser sich stabilisierend auf die doppelhelikale Struktur auswirkt.

Man erkennt im Spektrum ähnlich wie beim Mg^{2+} Poly A eine Aufspaltung der Bande um 1240 cm^{-1}, die bei der D_2O hydratisierten Probe nicht auftritt. Das zeigt, daß die Phosphatgruppen den Basen zugekehrt sind (vgl. Kap. 7.2) und ist zugleich ein schöner Beweis für die von Rich und Davies (17) postulierte Struktur, denn in dieser sind die Phosphatgruppen mit den Aminogruppen der Basenreste über Wasserstoffbrücken verknüpft. Die symmetrische $>PO_2^-$ Valenzschwingung bei 1080 cm^{-1} wird bei der Helixbildung wesentlich intensiver, was vermutlich davon herrührt, daß die Phosphatgruppe als Akzeptor für diese kräftigen Wasserstoffbrücken dient. Die antisymmetrische O-P-O Valenzschwingung wandert bei der Helixbildung von 824 cm^{-1} nach 808 cm^{-1}, die entsprechende symmetrische Schwingung bei 769 cm^{-1} gewinnt an Intensität.

Bei der Doppelhelixbildung ändert sich hiernach an der Konformation des Rückgrats, wie es im Einzelstrang vorliegt, nichts (vgl. Abb. 9 mit Abb. 28).

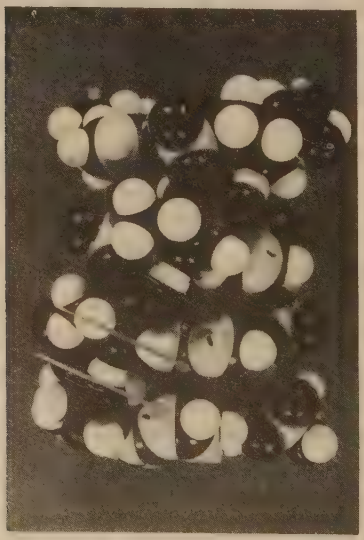


Abb. 24: Modell der protonierten Poly A Doppelhelix

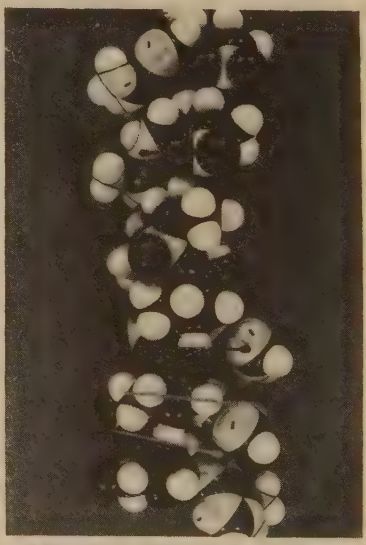


Abb. 25: Modell der einsträngigen Poly A Monohelix

Betrachtet man die Poly A Monohelix (Abb. 25), so sieht man, wenn man von der 2'OH Gruppe auf die mit ihr durch die Wasserstoffbrücke verbundene C-O-C Aethergruppierung der Nachbarribose blickt, daß die Basenebenen im Uhrzeigersinn etwas gegeneinander verdreht sind. Diese Verdrillung des Rückgrats muß aber auch in der Doppelhelix fortbestehen können (Abb. 24), wenn die Wasserstoffbrücken ausgebildet sind. Dadurch bleibt unter den vier Orientierungsmöglichkeiten, die die Rückgrate in einer Doppelhelix relativ zueinander einnehmen können, nur noch eine Möglichkeit bestehen. Man kann sofort sagen, daß beide Rückgrate gleichläufig sein und sich im Uhrzeigersinn umschlingen müssen. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigt, daß diese Forderung erfüllt ist. Zum Vergleich sei erwähnt, daß die Rückgrate der DNS gegenläufig sind und sich entgegen dem Uhrzeigersinn umschlingen.

Die antisymmetrische Riboseskelettschwingung der Gruppierung $\begin{matrix} C \\ C \end{matrix}\!>\!C\text{-}O$ bei 1130 cm^{-1} wird beim Protonieren, bzw. bei der Helixbildung wesentlich intensiver (Abb. 27), dasselbe trifft für die entsprechende symmetrische Schwingung bei 859 cm^{-1} zu (Abb. 29). Dies zeigt, daß hier die Konformation der Ribose ähnlich der in der Monohelix ist.

Die Protonierung der Adeninbase ist theoretisch am N(1) Stickstoff und N(3) Stickstoff des Purinkerns, sowie an der Aminogruppe in C(6) Stellung möglich. Daß die Aminogruppe nicht betroffen sein kann, machen die starken Veränderungen an den Ringschwingungen (Abb. 27 und 28, Tab. 9) deutlich. Am effektvollsten wäre wohl die Protonierung am N(1) Stickstoff, da dieser der Phosphatgruppe des anderen Stranges jeweils direkt benachbart ist, doch wurde festgestellt, daß auch N(3) betroffen ist (57). Ueber das Besetzungsverhältnis sind jedoch keine genaueren Daten bekannt. Bei einer NMR-Untersuchung von Purin-Lösungen fanden Read et al. (75), daß das Proton sich bevorzugt an das N(1) anlagert, wobei sich die Ladung durch Mesomerie über das ganze Molekül verteilt.

Im folgenden werden die Veränderungen an den Schwingungen der Basen im Bereich 1800 - 1550 cm^{-1} diskutiert, die bei der Protonierung und Helixbildung auftreten.

Beim Protonieren ändern die meisten Ringschwingungen ihre Lage und Intensität mehr oder minder stark. Am meisten betroffen ist die höchstgelegene des neutralen Poly A bei 1655 cm^{-1}. In dem Maße, in dem sie Intensität verliert, entstehen Banden bei 1715 cm^{-1} und 1680 cm^{-1}.

In der Poly A Doppelhelix gehen von jeder Aminogruppe zwei Wasserstoffbrücken aus und verbinden beide Stränge miteinander. In der Sekundärstruktur sind aus sterischen Gründen die Basenpaare propellerartig verdrillt (17), und der H-N-H Winkel ist etwas verzerrt. Die zwei kräftigen Wasserstoffbrücken bewirken, daß die Bande der $-NH_2$ Deformationsschwingung nach höheren Wellenzahlen rutscht und mit der Schwingung der protonierten Basenreste koppelt. Hierdurch entstehen die beiden bei 50% Protonierung bei 1715 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} beobachteten Banden. Beim H-D-Austausch verschwindet die $-NH_2$ Deformationsschwingung. Man beobachtet nur eine Bande bei 1664 cm^{-1}. Das beweist die Beteiligung der $-NH_2$ Schwingung an dem Bandenpaar. Sobald bei höheren Protonierungsgraden die Sekundärstruktur wieder teilweise zusammenbricht, kann die Bande bei 1680 cm^{-1} nicht mehr beobachtet werden, da sie verdeckt wird.

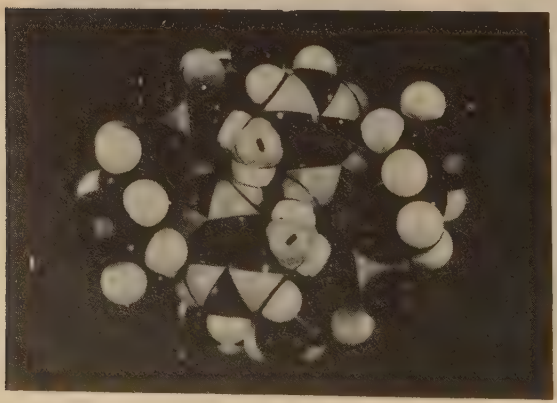


Abb. 26: Modell der protonierten Poly A Doppelhelix

Die Bande bei 1695 cm^{-1} gewinnt jetzt immer mehr an Intensität. Auch in den getrockneten Proben wird sie auf Kosten der bei 1715 cm^{-1} gelegenen Bande intensiver was den weitgehenden Strukturzusammenbruch anzeigt. In ihr fallen die $-NH_2$ Deformationsschwingung und die höchstgelegene Ringschwingung, die bei ausgebildeter Struktur miteinander koppelten, nun zusammen.

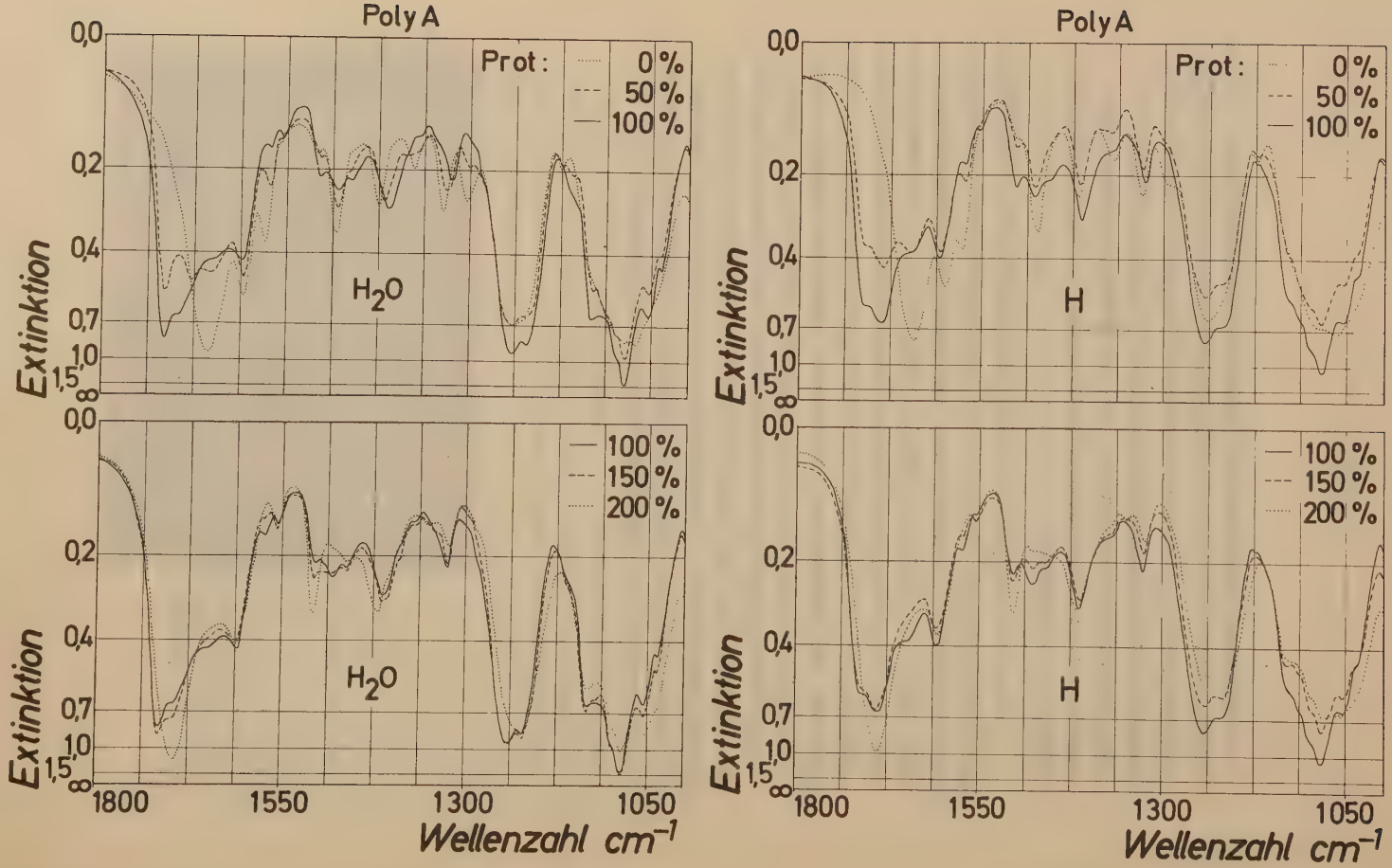
Wenn bei 200% Protonierung die Doppelhelix vollständig zusammengebrochen ist, ist auch die Doublettstruktur der Bande um 1240 cm^{-1} verschwunden. Man findet nur eine Bande bei der relativ kleinen Wellenzahl von 1223 cm^{-1}, unabhängig davon, ob die Probe hydratisiert oder getrocknet ist. Der Sachverhalt, daß man hier nur noch eine Bande beobachtet, zeigt, daß die $>PO_2^-$ Gruppe nun im Rückgrat nach außen gekehrt ist. Die starke Verschiebung nach kleineren Wellenzahlen weist auf kräftige Wasserstoffbrücken hin. Vermutlich werden diese im Knäuel zu NH^+ Gruppen benachbarter protonierter Basenreste ausgebildet. Diese Brücken sind so kräftig, daß sie offenbar durch Hydratwasser nicht aufgebrochen werden, denn die Bandenlage ist unabhängig vom Hydratationsgrad.

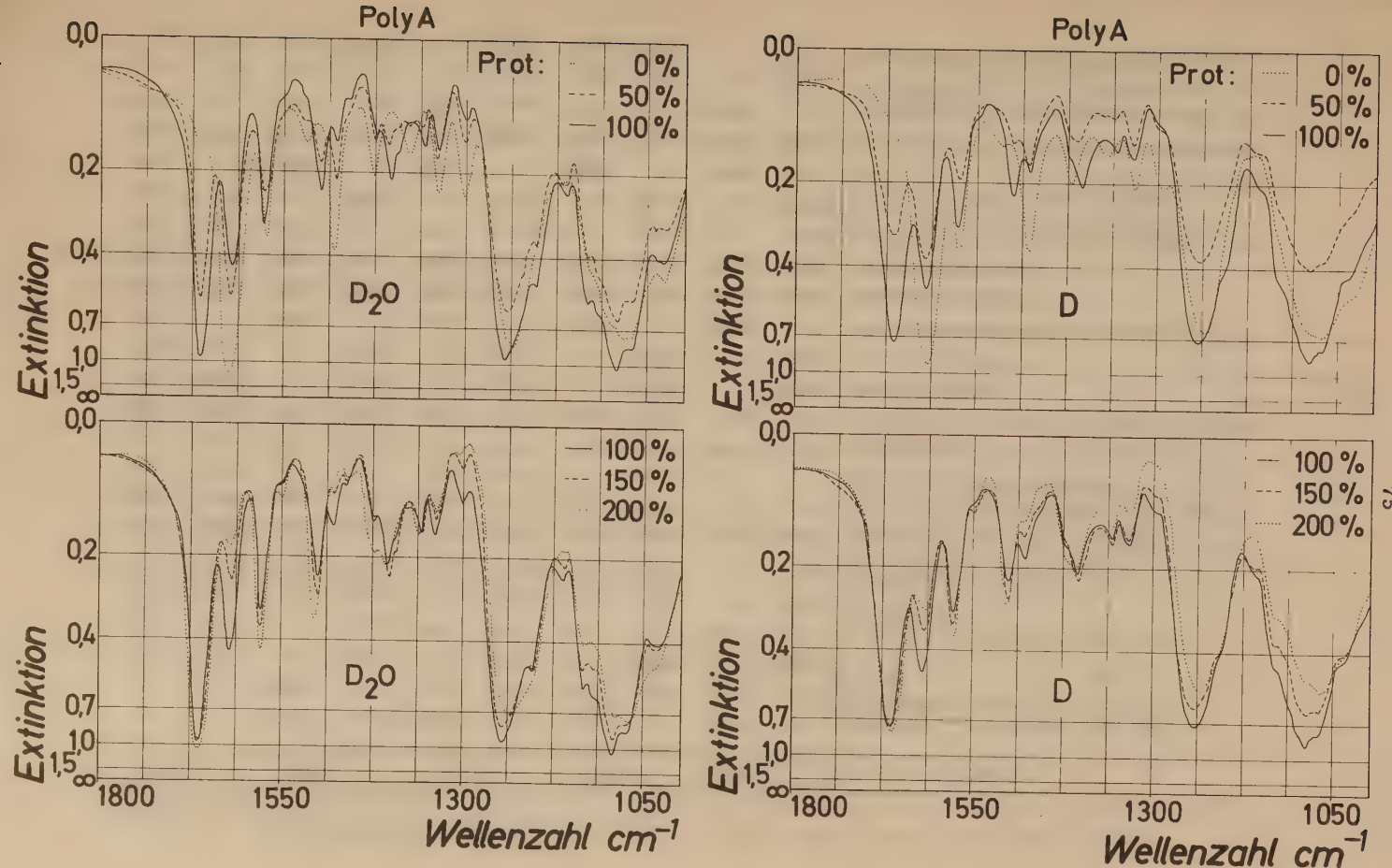
Abb. 27 und 28 (siehe S. 74 und 75):

IR-Spektren des K^+ Poly A bei verschiedenen Protonierungsgraden

links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
rechts: scharf getrocknet

Abb. 27: H-Form
Abb. 28: D-Form


Poly A
Prot: 0 %
50 %
100 %
H_2O
Extinktion
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
100 %
150 %
200 %
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm^{-1}
H


Poly A
Prot: 0 %
50 %
100 %
D_2O
D
100 %
150 %
200 %
Extinktion
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm^{-1}

0%		50%		100%		150%		200%		Protonierungsgrad
-	-	1714	-	1715	-	1715	-	-	-	Ringschw., gekoppelt mit der Deformationsschw.der geb.-NH_2 Gruppe
-	-	1680	-	-	-	-	-	-	-	
-	-	-	(1664)	-	(1664)	-	(1664)	-	(1664)	
-	-	-	-	1695	-	1699	-	1695	-	Ringschw.(CN Anteil)der prot. Adeninbasen
1655	(1625)	1653	(1622)	1650	(1621)	1652	(1620)	-	-	Ringschw.(CN Anteil) der unprotonierten Adeninbasen
1608	(1575)	1609	(1577)	1610	(1579)	1613	(1579)	1613	(1578)	Ringschwingung (C=C Anteil)
1580	-	1573	-	1573	-	1573	-	-	-	-NH_2 Deformationsschwingung der unprotonierten Basen
-	-	1506	(1500)	1505	(1500)	1507	(1500)	1508	(1505)	Ringschw.der protonierten Basen
1483	(1482)	1482	(1478)	1481	(1479)	1483	(1478)	-	-	Ringschw.der unprotonierten Basen
1426	(1427)	-	(1425)	-	(1425)	-	(1423)	-	(1422)	Ringschwingung
-	-	-	(1407)	-	(1405)	-	(1403)	-	(1407)	
-	-	1418	-	1413	-	1415	-	1420	-	NH^+ Deformationsschwingung (?)
1378	(1379)	1388	(1361)	1387	(1359)	1389	(1358)	1402	(1358)	Ringschwingung
1338	(1340)	1333	(1341)	1327	(1340)	1327	(1338)	1324	(1339)	Ringschwingung
1306	-	1302	-	1300	-	-	-	-	-	CN Valenzschw.der Aminogruppe in der H-Form gekoppelt mit der >N-H Deformationsschwingung
-	(1303)	-	(1303)	-	(1303)	-	(1303)	-	(1306)	
-	-	1282	-	1287	-	1283	-	1285	-	
1240	(1237)	1243	(1240)	1242	(1246)	1243	(1245)	1235	(1238)	antisymmetrische $>PO_2^-$ Valenzschw.
1220	-	1225	-	1222	-	1222	-	1222	-	In-plane-Deformationsschwingung der 2'OH Gruppe
-	-	-	(1205)	-	(1205)	-	(1205)	-	(1205)	ND_2 Deformationsschwingung

1176	(1165)	1176	(1165)	1175	(1162)	1165	(1162)	-	-	In-plane-CH-Deformationsschwingung
1138	(1130)	1133	(1135)	1135	(1135)	1135	(1135)	1135	(1135)	antisym.Valenzschwingung der C>C-O Gruppierung der Ribose
-	-	-	(1122)	-	(1120)	-	(1123)	-	-	
1088	(1072)	1088	(1072)	1088	(1072)	1088	(1070)	1087	(1070)	symmetrische $>PO_2^-$ Valenzschwingung
1055	-	1057	-	1057	-	1058	-	1055	-	antisym. C-O-C Valenzschw.der Ribose
1033	-	1039	(1041)	1038	-	1039	-	1038	(1037)	
-	(1027)	-	(1025)	-	(1030)	-	(1033)	-	(1028)	In-plane-Deformationsschw.der 2'OD Gr.
995	-	991	-	992	-	992	-	993	-	Riboseschwingung
965	(958)	963	(948)	963	(950)	963	(951)	966	(959)	Riboseschwingung
936	-	?	-	936	-	939	-	939	-	Out-of-plane-Schw. der 2'OH Gruppe (?)
913	(913)	914	(910)	913	(911)	914	(910)	913	(911)	Riboseschwingung
882	(880)	877	(874)	878	(874)	878	(873)	880	(876)	
866	(865)	858	(856)	858	(857)	859	(856)	860	(860)	sym.Valenzschwingung der C>C-O Gruppe der Ribose
825	(822)	-	-	-	-	-	-	-	-	
796	(795)	797	(796)	798	(797)	-	(797)	-	-	antisym. O-P-O Valenzschwingung
785	(782)	783	(784)	782	(785)	782	(785)	783	(784)	Out-of-plane Schwingung der Basen
768	(760)	771	(767)	771	(767)	771	(766)	771	(766)	symmetrische O-P-O Valenzschwingung
724	(715)	723	(714)	722	(713)	721	(712)	721	(712)	Riboseschwingung
703	(699)	704	(699)	703	(699)	703	(698)	703	(698)	
-	(674)	-	(668)	-	(669)	-	(668)	-	(667)	
648	(648)	643	(649)	642	(650)	642	(650)	642	(652)	
-	-	635	(638)	633	(639)	632	(639)	633	(640)	
-	-	625	(626)	625	(625)	625	(624)	625	(625)	
-	-	592	(579)	594	(580)	593	(580)	593	(578)	
-	-	563	-	563	-	565	-	563	-	

Tabelle 9: Bandenlagen (in cm^{-1}) des verschieden stark protonierten Poly A bei 75% rel. Luftfeuchtigkeit H_2O (D_2O)

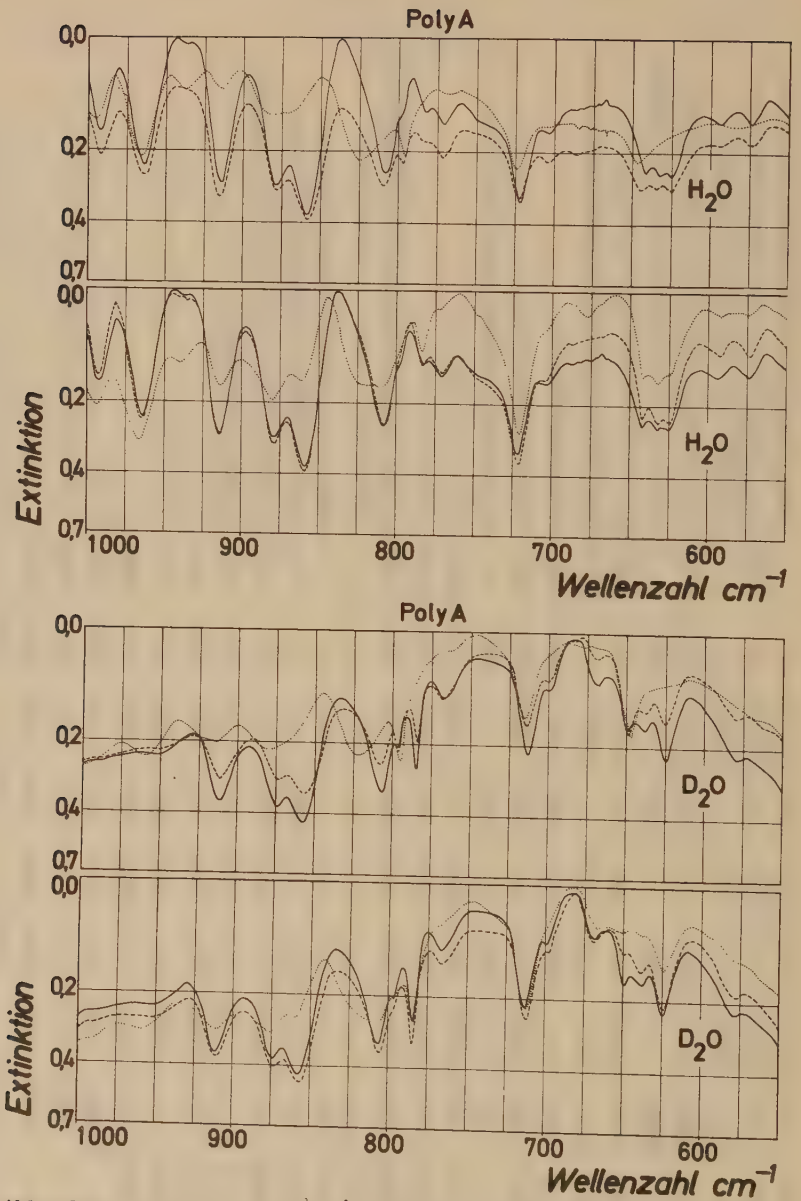


Abb. 29: IR-Spektren des K^+ Poly A bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit und verschiedenen Protonierungsgraden:
oben: 0%·····, 50%-----, 100% ———
unten: 100%———, 150%-----, 200% ·····

8.2 Die halbprotonierte Poly C Doppelhelix

In schwach saurem Milieu lagert Poly C ein Ueberschußproton an den N(3) Stickstoff der Cytosinbase an. Ist die Hälfte aller Basen in der polymeren Kette des Poly C protoniert, so verbinden sich jeweils zwei Stränge zu einem stabilen Assoziat (Schema S. 18). An ihrer Verknüpfung nimmt das Proton in einer $NH^+ \cdots H$ Wasserstoffbrücke teil.

Die Polarisierbarkeit symmetrischer Wasserstoffbrücken mit einem Doppelminimum-Potential (Abb. 30) ist um mehr als zwei Größenordnungen größer als die Polarisierbarkeit von Elektronensystemen (76) (77). Dies führt z. B. zu zwei Arten von Wechselwirkungen: erstens zu Protonen-Dispersionskräften zwischen den einzelnen Wasserstoffbrücken (78) und zweitens zu einer Induktions-Wechselwirkung zwischen diesen Wasserstoffbrücken einerseits und den Feldern der Anionen und den Dipolen von Solvat-Molekülen andererseits (79). Beide Wechselwirkungen verursachten eine beträchtliche Verschiebung der Energieniveaus der Protonen.

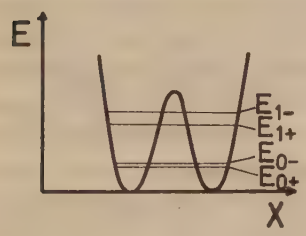


Abb. 30: Symmetrisches Doppelminimum-Potential

In Lösung sind Substanzen mit einer entsprechenden $NH^+ \cdots N$ Brükke bereits eingehend untersucht (80) (81) (82), so das halbprotonierte Purin (80), Imidazol, Pyrazol (81) sowie insbesondere das Poly-L-Histidin (82).

Die Abstände und Orientierungen der Wasserstoffbrücken untereinander, wie auch die zwischen ihnen und den Anionen können in Lösung in einem weiten Rahmen statistische Werte annehmen. Damit nimmt auch die Stärke der Wechselwirkung dieser Wasserstoffbrücken mit der Umgebung eine Vielfalt von Werten an, was sich in einer Mannigfaltigkeit von Energieniveaus der Protonen und damit in einer kontinuierlichen Absorption dieser Lösungen über weite Bereiche ihres IR-Spektrums äußert.

Der Bereich 4000 - 2000 cm^{-1}

In der halbprotonierten Doppelhelix des Poly C ist der Abstand zwischen den $\gtrless NH^{+} \cdots N \lessgtr$ Brücken jedoch weitgehend durch die Sekundärstruktur festgelegt und nur in einem beschränkten Rahmen variabel. Außerdem sind die $\gtrless NH^{+} \cdots N \lessgtr$ Brücken so benachbart angeordnet, daß sie sich gegenseitig stark polarisieren und damit wird die Tunnelfrequenz sehr niedrig. Aus diesen Gründen kann man hier ähnlich wie bei den Carbonsäuredimeren nur eine extreme Bandenverbreiterung an Stelle eines Kontinuums beobachten.

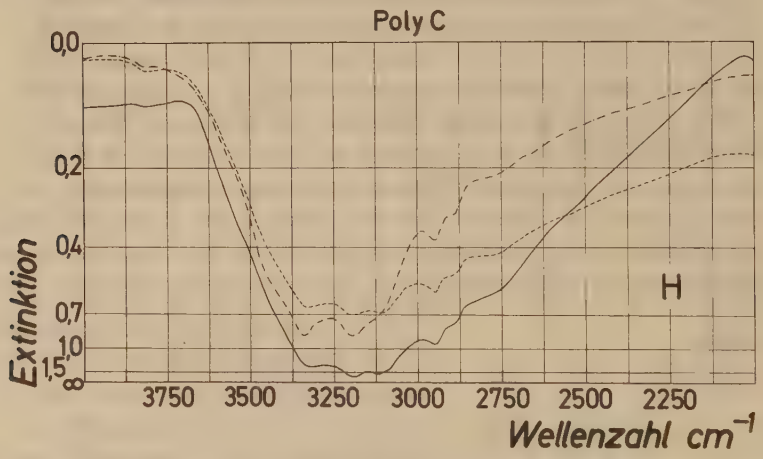


Abb. 31: IR Spektren der getrockneten Kaliumsalze
-·-·- unprotoniert, ---- halbprotoniert (schnelle HCl-Zugabe), ——— halbprotoniert (langsame HCl-Zugabe)

Abb. 31 zeigt das IR-Spektrum des unprotonierten Poly C im Vergleich mit den Spektren zweier halbprotonierter Proben. Das Auftreten des Kontinuums sowie die im nächsten Abschnitt diskutierten Basenschwingungen um 1700 cm^{-1} zeigen, daß man im Falle einer schnellen HCl-Zugabe ein protoniertes Knäuel erhält, in dem die Wasserstoffbrücken in unregelmäßiger Folge zu zufällig benachbarten Basen gebildet werden.

Gibt man die Säure jedoch tropfenweise und unter Rühren hinzu (vgl. S. 11), so kann sich eine Doppelhelix ausbilden. In diesem Fall reicht eine extrem breite Bande, die von der $\geqslant NH^{+}\cdots N\leqslant$ Brücke herrührt, vom Bereich der NH_2 Valenzschwingung bei 3400 - 3100 cm^{-1} bis herunter zu Wellenzahlen von etwa 2100 cm^{-1}.

Die durch die Polarisierbarkeit verursachten Protonendispersionskräfte sind für die Stabilität der Doppelhelix von großer Bedeutung, denn die starke elektrostatische Abstoßung der Ueberschuß-Protonen würde die Bildung einer stabilen Doppelhelix verhindern. Diese wird jedoch durch den Energiegewinn kompensiert, der durch die wechselseitige Polarisation der Bindungen erreicht wird.

Der Bereich 1800 - 1000 cm^{-1}

Durch die Anlagerung eines Protons an den N(3) Stickstoff wird die Mesomeriestabilisierung der Cytidinbase, die zu dem relativ niedrigen Wert der Carbonylschwingung von 1655 cm^{-1} führte (siehe S. 33), gestört. Wenn nur die Hälfte der Basen protoniert wird, verliert diese Schwingung an Intensität, während eine weitere Carbonylschwingung bei 1725 cm^{-1} erscheint. Die größere Wellenzahl weist auf den erhöhten Doppelbindungscharakter der Carbonylgruppe in den protonierten Basen hin. Der Befund, daß man auch in der halbprotonierten Doppelhelix beide C=O Valenzschwingungen beobachten kann, zeigt, daß die Tunnelfrequenz durch die starke gegenseitige Polarisierung der $\geqslant NH^{+}\cdots N\leqslant$ Brücken sehr beträchtlich verkleinert ist. Die unterschiedliche Wellenzahl der beiden Carbonylschwingungen eines Basenpaares ist aber auch die Erklärung dafür, daß sie trotz gleich gerichteter Uebergangsmomente (Abb. 32) nicht miteinander koppeln können. Zwischen den beiden Carbonylschwingungen beobachtet man in der H Form eine Bande, die bei ausgebildeter Sekundärstruktur stärker in Erscheinung tritt. Beim Deuterieren verschwindet sie, gleichzeitig wandert die höher gelegene C=O Bande nach klei-

neren Wellenzahlen. Das bedeutet, daß es sich hier um die $-NH_2$ Deformationsschwingung handelt, die mit der Carbonylschwingung der protonierten Base koppelte. Dies zeigt die Ausbildung der Doppelhelix an, denn eine solche Kopplung setzt voraus, daß die $-NH_2$ Gruppe in einer entsprechenden Orientierung zur Ringebene festgehalten ist.

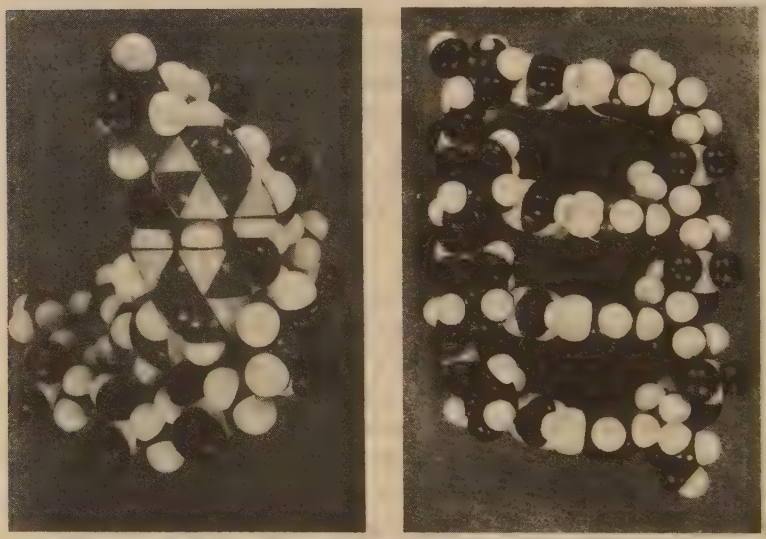


Abb. 32 und 33: Modell der protonierten Poly C Doppelhelix

Um 775 cm^{-1} zeigt die Verschiebung der Out-of-plane-Schwingung der CH Gruppen der Basen von 788 cm^{-1} nach 767 cm^{-1}, daß sich an ihr auch die NH^+ Gruppe beteiligt (Abb. 35).

Auch die Riboseschwingungen verändern sich sehr beim Protonieren: Während beim unprotonierten K^+ Salz die Bande der C-O-C Aether-Gruppierung des Furanringes bei 1058 cm^{-1} besonders scharf hervortritt, ist sie nun stark verbreitert. Die 2'OD Deformationsschwingung erscheint bei 1038 cm^{-1}, d. h. diese Schwingung ist nicht mehr durch Kopplung mit der Riboseschwingung nach kleinen Wellenzahlen verschoben.

Einen Grund dafür kann man nur in einem gegenüber dem einsträngigen Poly C stark veränderten Rückgrat der protonierten Doppelhelix sehen. Man kann sich gut vorstellen, daß die positiv geladenen $\gtrless NH^+ \cdots N\lesssim$ Gruppen, die in der Doppelhelix übereinandergestapelt angeordnet sind, durch ihre gleichnamigen Ladungen die Ebenen der gepaarten Basen so weit wie möglich auseinanderdrücken. Dabei wird das Rückgrat gedehnt und die Wasserstoffbrücken zwischen der 2'OH Gruppe und dem Aether-Sauerstoff der benachbarten Ribosegruppen werden aufgebrochen. Man sieht sofort, daß die 2'OD Gruppen frei drehbar geworden sind und damit nicht mehr koppeln können.

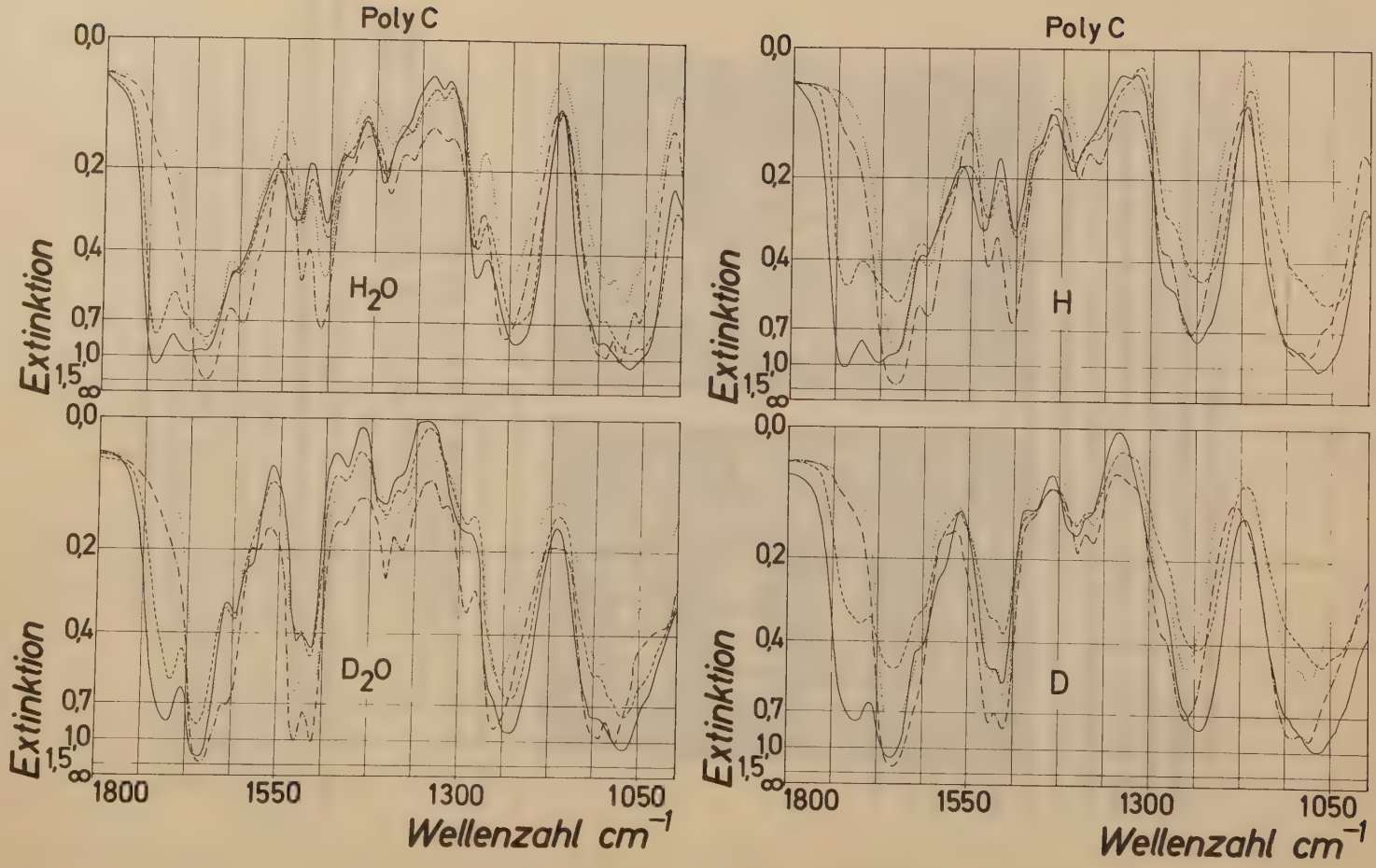
Abb. 34 und 35 (siehe S. 84 und 85):

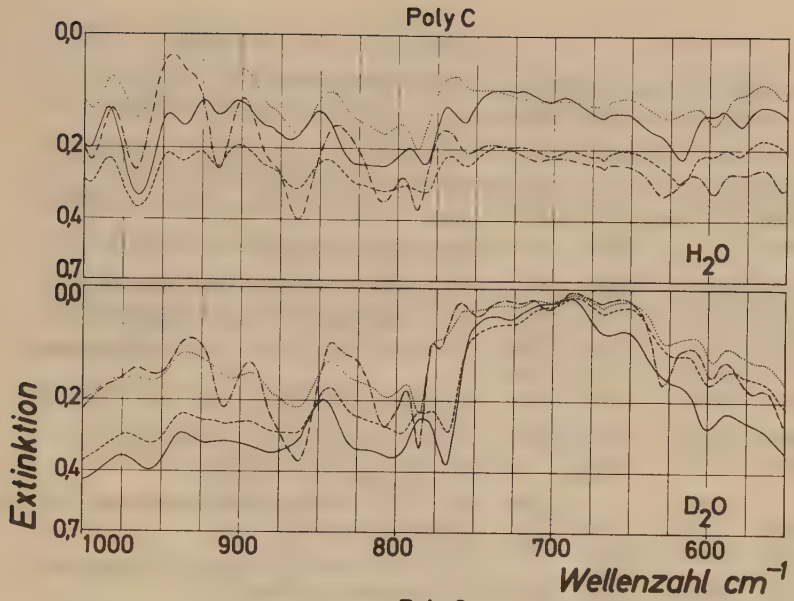
IR-Spektren des K^+ Poly C bei verschiedenen Protonierungsgraden

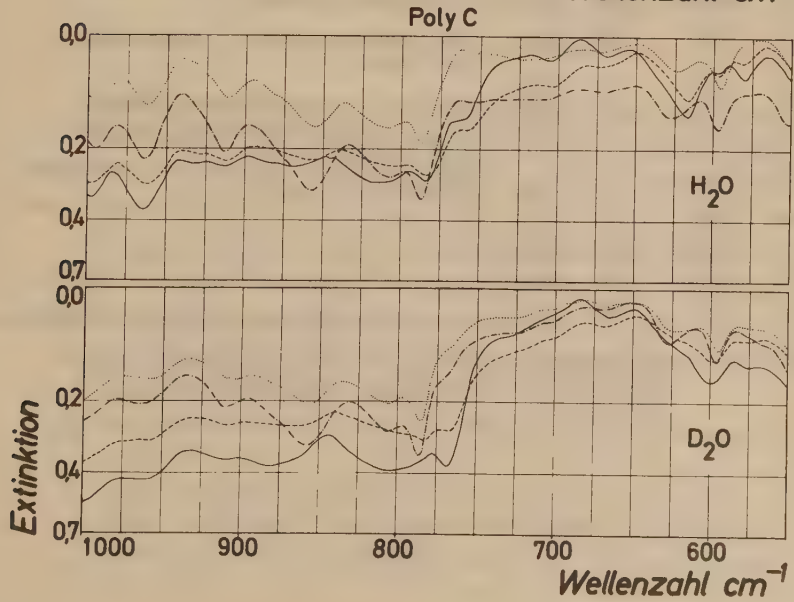
K^+ Salz: -·-·- 0%, ——— 50% (langsame Säurezugabe)
----- 50% (schnelle Säurezugabe)
Cs^+ Salz: ···· 0%

Abb. 34: links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit, rechts:scharf getrockne

Abb. 35: oben: bei 75% rel. Luftfeuchtigkeit, unten:scharf getrocknet


Poly C
Poly C
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
Extinktion
H_2O
D_2O
H
D
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm^{-1}


Poly C
0,0
0,2
0,4
0,7
H2O
D2O
Extinktion
1000
900
800
700
600
Wellenzahl cm-1


Poly C
0,0
0,2
0,4
0,7
H2O
D2O
Extinktion
1000
900
800
700
600
Wellenzahl cm-1

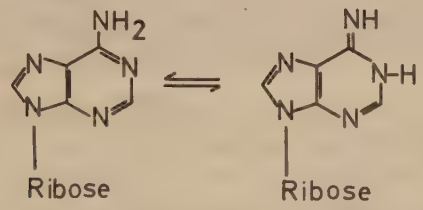
0%		50%		Protonierungsgrad
-	-	1727	(1702)	C=O Valenzschwingung der prot. Cytosinbase
-	-	1683	-	$-NH_2$ Deformationsschw. gekoppelt mit der C=O Valenzschwingung
1655	(1655)	1657	(1657)	C=C Valenzschw.der unprot.Cytosinbase
1607	-	1615	-	In-plane-Deformationsschwingung der $-NH_2$ Gruppe
1460	(1460)	1458	(1457)	$-CH_2-$ Deformationsschw.der Ribose
1290	(1290)	1285	(1290)	CN Valenzschw.der exocycl.Aminogr.
-	-	-	(1234)	ND_2 Deformationsschwingung
1244	(1250)	1228	(1226)	antisym.Valenzschw.der $>PO_2^-$ Gruppe
1117	(1117)	1134	(1134)	
1105	(1105)	1113	(1115)	antisym.Valenzschw.der $\begin{matrix}C\\C\end{matrix}\!>\!C-O$ Gruppierung der Ribose
1085	(1083)	1077	(1072)	sym.Valenzschw.der $>PO_2^-$ Gruppe
1058	-	1068	( )	antisymmetrische C-O-C Valenzschwingung der Ribose
-	(1015)	-	(1038)	In-plane-Deformationsschw.der 2'OD Gr.
995	-	996	-	Riboseschwingung
966	(956)	964	(957)	Riboseschwingung
935	-	935	-	Out-of-plane-Schw.der 2'OH Gruppe (?)
914	(910)	913	(921)	Riboseschwingung
883	(878)	886	(871)	
863	(867)	868	(865)	sym.Valenzschw.der $\begin{matrix}C\\C\end{matrix}\!>\!C-O$ Gruppe der Ribose
829	(829)	829	(825)	
809	(807)	810	(802)	antisym. O-P-O Valenzschwingung
788	(785)	782	(767)	Out-of-plane-Schwingung der Base (NH^+ Beteiligung)
758	(748)	-	-	symmetrische O-P-O Valenzschwingung
-	(720)	-	(725)	Riboseschwingung
710	(703)	703	-	
-	(668)	667	(667)	
630	(629)	617	(629)	
597	(598)	597	(601)	
578	(572)	580	-	

Tabelle 10: Bandenlagen (in cm^{-1}) des K^+ Poly C bei 0% und 50% Protonierung, relative Luftfeuchtigkeit 75% H_2O (D_2O)

9.0 Die Doppelhelix des Ca^{2+} Poly A

Die Abb. 38 und 39 zeigen das Spektrum des Ca^{2+} Poly A zusammen mit den Spektren des unprotonierten und des 100% protonierten K^+Salzes. Man sieht, daß sich das Spektrum des Ca^{2+} Poly A grundlegend vom Spektrum des neutralen K^+ Poly A unterscheidet, dafür aber in mancher Beziehung dem der protonierten Poly A Doppelhelix ähnlich ist.

Eine große Anzahl von Fakten zeigt an, daß Ca^{2+} Ionen die Aminogruppe der Adeninbase des Poly A in eine Iminogruppe umwandeln.



Amino - Imino-Tautomerie der Adeninbase

Tautomere Formen sind beim Guanin (83) und beim Cytidin (84) bekannt und wurden eingehend mittels Kernresonanz untersucht. Auch beim Cytidin handelt es sich um eine Amino-Imino-Tautomerie.

Folgende Beobachtungen im Spektrum des Ca^{2+} Poly A zeigen, daß das tautomere Gleichgewicht der Adeninbase weitgehend zugunsten der Iminoform verschoben ist.

a) Die Bande der $-NH_2$ Scherenschwingung bei 1580 cm^{-1} ist weitgehend verschwunden
b) Das gleiche trifft für die $-ND_2$ Scherenschwingung bei 1205 cm^{-1} zu
c) Im K^+ Poly A beobachtet man bei p_H = 7 im Bereich 3400 - 3100 cm^{-1} ein intensives Bandendoublett. Es wird von der NH Valenzschwingung und der Oberschwin-

gung der $-NH_2$ Scherenschwingung verursacht (siehe S.29), wobei letztere ihre Intensität durch Fermiresonanz von der Valenzschwingung erhält. Abb. 36 entnimmt man, daß die eine der beiden Komponenten wesentlich an Intensität verliert.

d) Alle Ringschwingungen ändern sich grundlegend (siehe Abb. 38)

e) Aehnlich wie beim Poly U findet man die CN Valenzschwingung an der Flanke der antisymmetrischen $>PO_2^-$ Valenzschwingung bei 1281 cm^{-1}. Bei der D_2O hydratisierten Probe findet man diese Bande in ihrer ursprünglichen Lage bei 1303 cm^{-1}. Dies zeigt, daß sie wie beim Poly U durch Kopplung mit der NH Deformationsschwingung nach kleineren Wellenzahlen verschoben wurde.

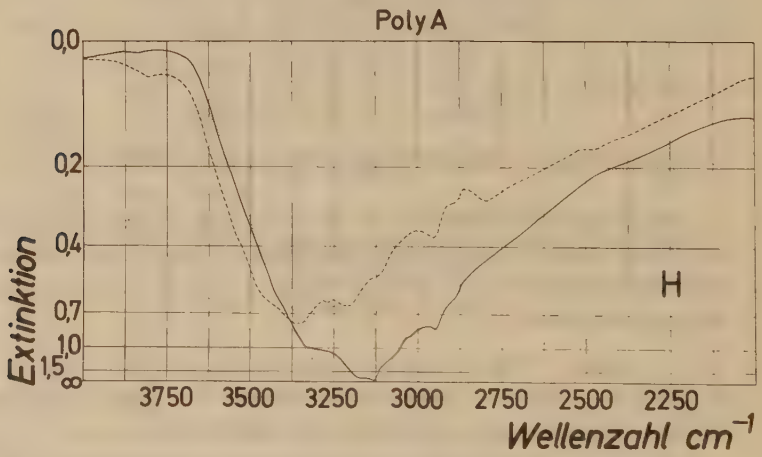


Abb. 36: IR-Spektren getrockneter Proben; K^+ Salze; ····· unprotoniert, ——— 100% protoniert; ----- Ca^{2+} Salz

Die Banden der $>PO_2^-$ Gruppe verhalten sich ähnlich wie im Fall der protonierten Poly A Doppelhelix. Die Bande um 1240 cm^{-1} ist aufgespalten, und diese Aufspaltung verschwin-

det in der D_2O hydratisierten Probe. Das zeigt, daß die $>PO_2^-$ Gruppen im Rückgrat den Basen zugekehrt sind. Die symmetrische Valenzschwingung der $>PO_2^-$ Gruppe hat an Intensität gegenüber dem K^+ Poly A bei $p_H = 7$ stark zugenommen, was darauf hinweist, daß diese Gruppe sich nun in einer stark polarisierenden Umgebung befindet. Auch die symmetrische und antisymmetrische Valenzschwingung der O-P-O Gruppe bei 784 cm^{-1} und bei 812 cm^{-1} zeigen ein ähnliches Verhalten wie bei der protonierten Doppelhelix. Diese Befunde stützen die in Abb. 37 gezeigte doppelhelikale Struktur des Ca^{2+} Poly A. Die Ca^{2+} Ionen verschieben das tautomere Gleichgewicht zugunsten der Iminoform und verknüpfen diese Gruppe mit der Phosphatgruppe, während die Basenpaarung analog zu der protonierten Poly A Doppelhelix erfolgt.

Eine monohelikale Struktur, bei der die Ca^{2+} Ionen gleichzeitig mit der Phosphatgruppe und der Iminogruppe in Wechselwirkung stehen, ist nicht möglich, wie am Kalottenmodell festgestellt werden konnte. Da das Ca^{2+} Poly A extrem unlöslich ist, konnte der Schmelzvorgang im UV nicht verfolgt werden.

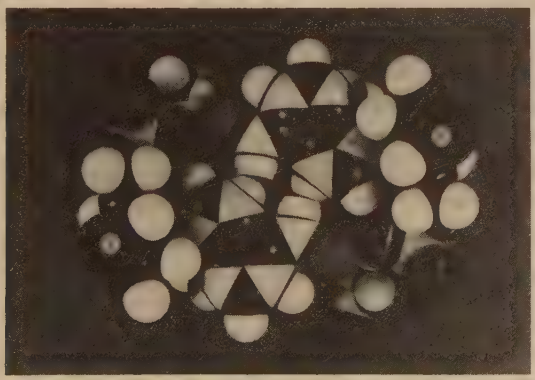


Abb. 37: Modell der Ca^{2+} Poly A Doppelhelix

Auch die meisten Banden der Riboseschwingungen sind verschoben, so wird z. B. um 1040 cm^{-1} die breite Schulter der Aethervalenzschwingung nicht beobachtet, was in Abb. 38 deut-

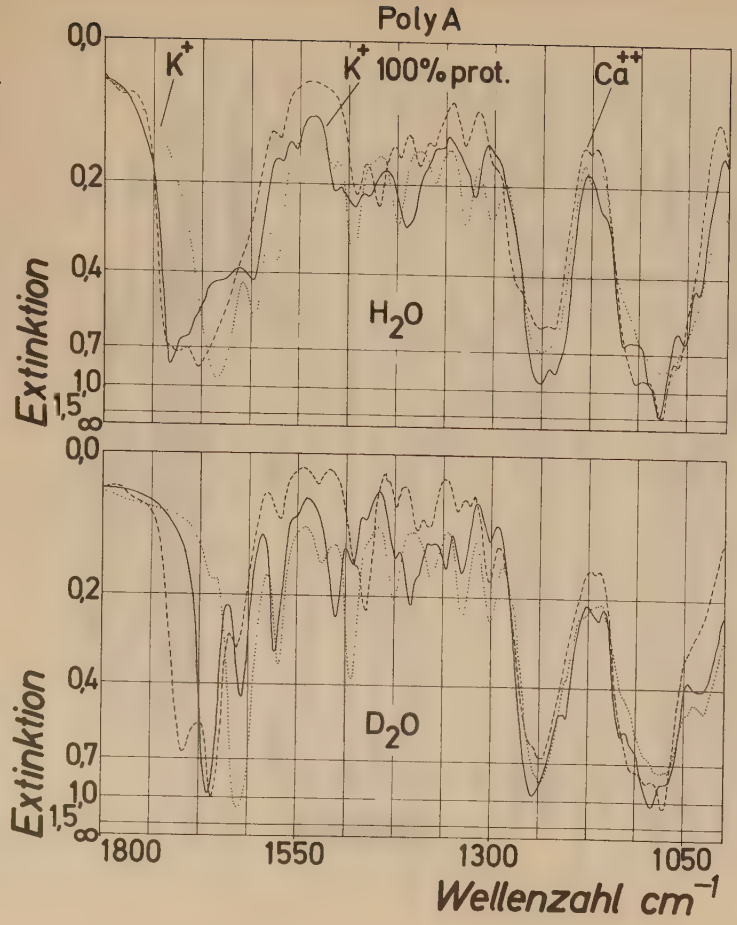
lich zu erkennen ist. Vermutlich ist diese Bande beim Ca^{2+} Poly A etwas nach größeren Wellenzahlen verschoben und geht damit in dem breiten Bandenkomplex unter. In der D_2O hydratisierten Probe tritt daher die OD Deformationsschwingung nur als deutliche Schulter in Erscheinung, obwohl die 2'OD Gruppe mit dem Aethersauerstoff der benachbarten Ribose verknüpft ist, was einerseits durch die Aufspaltung der Bande bei 1240 cm^{-1} angezeigt und andererseits durch das Kalottenmodell nahegelegt wird.

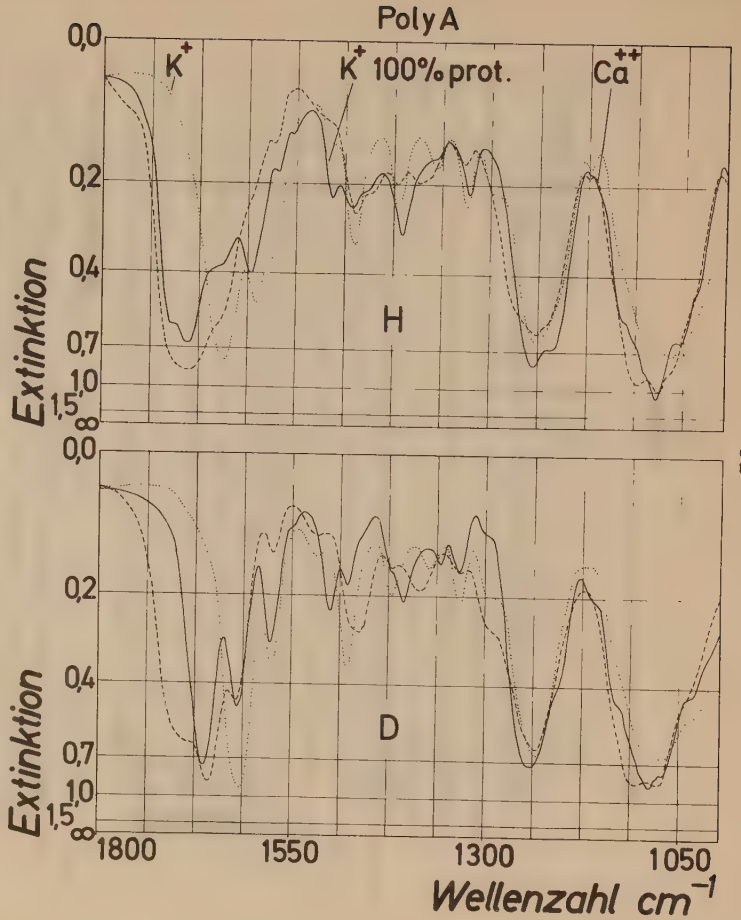
Wie bei der protonierten Poly A Doppelhelix findet man auch beim Ca^{2+} Poly A eine erhöhte Intensität der Riboseschwingung, die man ein wenig verschoben bei 1117 cm^{-1} findet. Dies zeigt an, daß die Ribose vermutlich in derselben Konformation vorliegt.

Im Bereich 1600 - 1700 cm^{-1} beobachtet man ein Doublett, das sich beim Deuterieren nach kleineren Wellenzahlen verschiebt. Bei diesen Banden handelt es sich um eine Ringschwingung, und um die exocyclische C=N Valenzschwingung, die miteinander koppeln.

Beim Trocknen bricht die Sekundärstruktur zusammen. Es verschwindet die Aufspaltung der Bande bei 1240 cm^{-1}. Dasselbe trifft für das Bandendoublett um 1705 cm^{-1} zu. Es ist nur noch eine breite Bande zu erkennen. Die etwas stärker hervortretende Bande bei 1647 cm^{-1} zeigt an, daß sich auch das tautomere Gleichgewicht wieder ein wenig mehr zugunsten der Aminoform verschoben hat.

Abb. 38: IR-Spektrum des Ca^{2+} Poly A im Vergleich mit verschieden stark protonierten K^+ Salzen
Ca^{2+} Salz: ---- K^+ Salz: .... 0% ——— 100%
links: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
rechts:scharf getrocknet


Poly A
K+
K+ 100% prot.
Ca++
H2O
D2O
Extinktion
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm−1


Poly A
K+
K+ 100% prot.
Ca++
H
D
Extinktion
0,0
0,2
0,4
0,7
1,0
1,5
∞
1800
1550
1300
1050
Wellenzahl cm−1

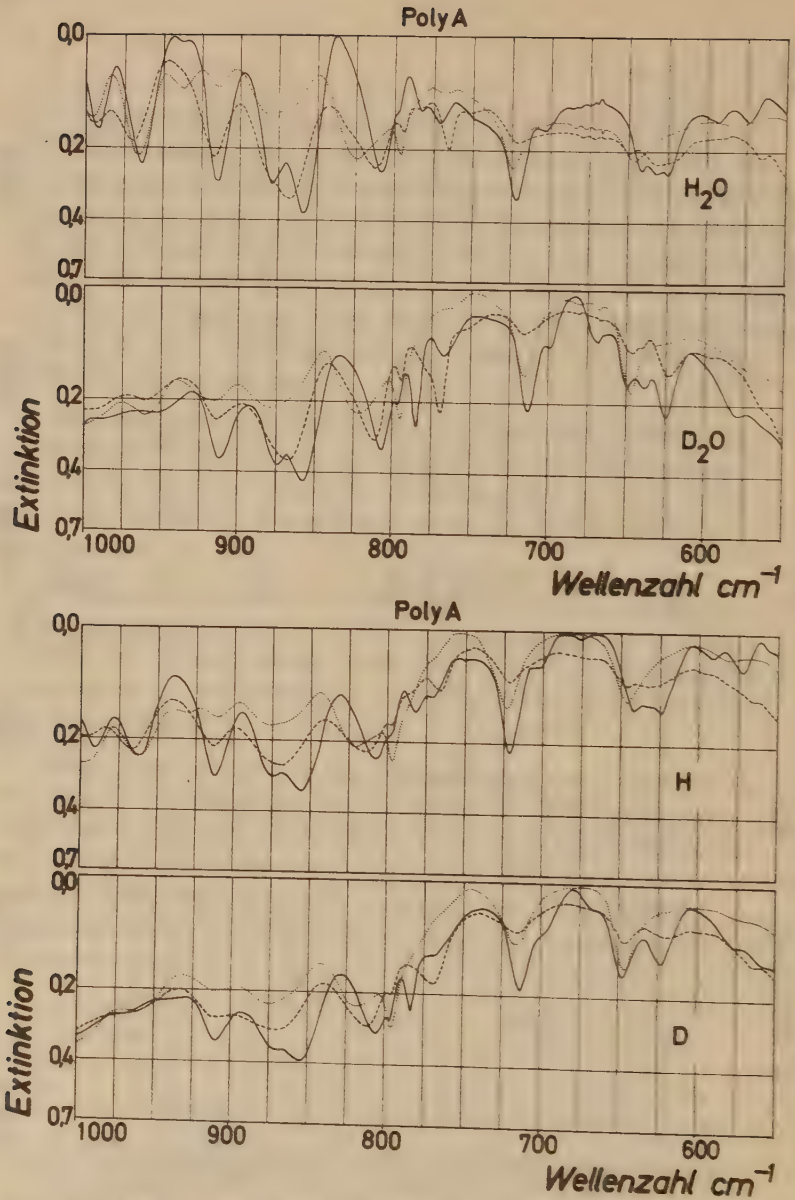


Abb. 39: IR-Spektrum des Ca^{2+} Poly A im Vergleich mit verschieden stark protonierten K^+ Salzen:
Ca^{2+} Salz: ----- K^+ Salz: ···· 0% ——— 100%
oben: bei 75% rel.Luftfeuchtigkeit
unten:scharf getrocknet

10.0 Zusammenfassung

1. Es wurden Filme der neutralen Alkali- und Erdalkalisalze des Poly A, Poly C und Poly U im hydratisierten, deuterierten und getrockneten Zustand IR-spektroskopisch untersucht. Außerdem wurden beim Poly A und Poly C die Messungen auch bei verschiedenen Protonierungsgraden durchgeführt. Hierzu wurden wäßrige Lösungen der Substanzen hergestellt, diese auf Probenträger aus polykristallinem Germanium aufgebracht und das Lösungsmittel durch ein Trockenmittel wieder entfernt. Um reproduzierbare Schichtdicken zu erhalten, mußte der Entzug des Lösungsmittels in einer Zentrifuge stattfinden, wobei der Probenträger auf einem Quecksilberbad schwamm. Die Filme wurden in Küvetten untersucht, die es gestatteten, den Grad der relativen Luftfeuchtigkeit definiert einzustellen.

2. Die Bandenzuordnung wurde, soweit sie möglich war, angegeben und nach der Literatur ergänzt. Es zeigte sich, daß bestimmte Schwingungen miteinander koppeln, wodurch die Banden aus der Normallage verschoben werden. Dazu müssen die Uebergangsmomente dieser Schwingungen in bestimmter Weise zueinander orientiert sein. Dies macht Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur möglich.

3. Die IR-Spektren zeigen, daß das Rückgrat einsträngiger Polynukleotide durch Wasserstoffbrücken zwischen der 2'OH Gruppe und dem Aethersauerstoff der benachbarten Ribosegruppe stabilisiert werden kann. Die Tendenz dazu nimmt vom Poly A über das Poly C zum Poly U hin ab.

4. Unter bestimmten Voraussetzungen bilden sich monohelikale Strukturen aus; sie werden durch Kationen mit stärkerem Feld begünstigt, die die Phosphatgruppe der Base zudrehen und so mit beiden Gruppen gleichzeitig in Wechselwirkung treten können.

5. Vom Mg^{2+} Poly U, - bei ihm ist bei Temperaturen unter $10^{o}C$ die Ausbildung einer besonders kooperativen Sekundärstruktur zu erwarten -, wurden IR-Spektren bei $5^{o}C$ und bei

Ag^{2+}-Aufnahmen. Die Spektren zeigen, daß dieser Komplexbildungsvorgang nicht mit einer Deprotonierung verbunden ist. Entscheidend ist die gleichzeitige Wechselwirkung der Mg^{2+}-Ionen mit den Phosphatgruppen und der Base.

6. Es wurde festgestellt, daß auch das Spektrum des Ca^{2+}-Poly A grundlegend von dem Spektrum des reinen Poly A unterscheidet. Es zeigt, daß die Ca^{2+}-Ionen die Helixform stabilisieren. In diesem Sinne bildet das Poly A eine Ausnahme, bei der die Ca^{2+}-Ionen die Protonierungsstufe mit der Basengruppe verknüpfen.

7. Die gewonnenen Poly A-Doppelhelix ermöglicht ein besseres Verständnis der Strukturfragen der, wobei die Konformation des Rückgrats wie bei Einzelstrangen festgestellt wurde, bestimmt.

8. Einen wichtigen Stabilisierungsfaktor der polyanionischen Poly A-Doppelhelix bilden Protonenübergangskomplexe. Die Mg^{2+} - N-Bindung polarisierenden sich wechselseitig, was zu einer Stabilisierung der Struktur führt. Durch die Anbindung der Basenprotonen verengt sich die Ebene der Basengruppe, wodurch die Stapelwechselwirkung begünstigt wird, was die Struktur des Rückgrats der Doppelhelix gegenüber dem Einzelstrang verändert.

Literatur

(1) R.Altmann: Arch.Anat.Physiol. 524 (1889)
(2) P.A.Levene, L.A.Mikeska und T.Mori: J.Biol.Chem. 85, 785 (1930)
(3) J.D.Watson und F.H.C.Crick: Nature 171, 737 (1953)
(4) W.D.Lubos: Dissertation, Universität München 1970
(5) T.Miyazawa in:"Poly-α-Amino Acids"; G.D.Fasman Ed. 2, 69, M.Dekker, Inc., New York 1967
(6) R.M.Izatt, J.J.Christensen und J.H.Rytting: Chem.Rev. 71, 439 (1971)
(7) K.P.Hoffmann und G.Zundel: Rev.Sci.Instr. 42, 11 (1971)
(8) J.Pitha: Biochim.Biophys.Acta 232, 607 (1971)
(9) G.Zundel:"Hydration and Intermolecular Interaction"; Academic Press, New York 1969
(10) H.G.Zachau: Angew.Chem. 81, 645 (1969)
(11) M.Grunberg-Manago, P.J.Ortiz und S.Ochoa: Science 122, 907 (1955)
(12) A.Rich und D.R.Davies: J.Amer.Chem.Soc. 78, 3548 (1956)
(13) G.Felsenfeld, D.R.Davies und A.Rich: J.Amer.Chem.Soc. 79, 2023 (1957)
(14) A.Rich: Biochim.Biophys.Acta 29, 502 (1958)
(15) E.O.Akrinmisi, C.Sander und P.O.P.T'so: Biochem. 2, 340 (1963)
(16) R.Langridge und A.Rich: Nature 198, 725 (1963)
(17) A.Rich, D.Davies, F.H.C.Crick und J.D.Watson: J.Mol.Biol. 3, 71 (1961)
(18) J.R.Fresco und E.Klemperer: Ann.N.Y.Acad.Sci. 81, 730 (1959)
(19) D.Barszcz und D.Shugar: Acta Biochim.Polonica 11, 481 (1964)
(20) A.M.Michelson: Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, London, Acad.Press 1963
(21) D.N.Holcomb und J.Tinoco jr.: Biopolymers 3, 130 (1965)
(22) M.Leng und G.Felsenfeld: J.Mol.Biol. 15, 455 (1966)
(23) J.Witz und V.Luzzati: J.Mol.Biol. 11, 620 (1965)
(24) R.F.Steiner und R.F.Beers:"Polynucleotides"; Elsevier Publ. Comp.Amsterdam 1961
(25) S.Wada: Conformation of Biopolymers; Acad.Press 1967

(26) E.W.Small und W.L.Peticolas: Biopolymers 10, 69 (1971)
(27) G.D.Fasman, C.Lindblow und L.Grossman: Biochem. 3, 1015 (1964)
(28) A.Gluik, H.Inone und V.Luzzati: J.Mol.Biol. 53, 221 (1970)
(29) E.G.Richards, C.P.Flessel und J.R.Fresco: Biopolymers 1, 431 (1963)
(30) P.Sarkar: J.Biol.Chem. 240, 2090 (1965)
(31) R.Steiner in: A.Veis, Biol. Polyelectrolytes; Dekker New York S. 78 (1970)
(32) B.Zmudzka und D.Shugar: Febs Letters 8, 52 (1970)
(33) A.Rabcenko und D.Shugar: Acta Biochim.Polonica 18, 4 (1971)
(34) D.F.Hornig, H.F.White und F.P.Reding: Spectrochim.Acta 23A, 969 (1967)
(35) G.Zundel, W.D.Lubos und K.Kölkenbeck: Can.J.Chem. 49, 3795 (1971)
(36) H.Wolff und H.Ludwig: Ber.Bunsenges.Physik.Chem. 70, 728 (1966)
(37) H.Wolff und D.Stachewski: Ber.Bunsenges.Physik.Chem. 66, 140 (1962)
(38) H.Wolff und J.Eints: Ber.Bunsenges.Physik.Chem. 70, 728 (1966)
(39) H.Wolff und D.Horn: Ber.Bunsenges.Physik.Chem. 71, 467 (1967)
(40) H.Wolff und D.Horn: Ber.Bunsenges.Physik.Chem. 72, 419 (1968)
(41) M.Tsuboi: Appl.Spectr.Rev. 3, 45 (1969)
(42) Y.Kyogoku, M.Tsuboi, T.Shimanouchi und I.Watanabe: Nature 189, 120 (1961)
(43) H.Fritsche: Z.Chem. 12, 1 (1972)
(44) M.Tsuboi: Appl.Spectr.Rev. 3, 45 (1969)
(45) S.Higuchi, M.Tsuboi und Y.Iitaka: Biopolymers 7, 909 (1969)
(46) M.Tsuboi, K.Shuto und S.Higuchi: Bull.Chem.Soc.Japan 41, 1821 (1968)
(47) T.Shimanouchi, M.Tsuboi und Y.Kyogoku in: Advances in chemical Physics VII, 435 (1964)
(48) H.T.Miles: Proc.Nat.Acad.Sci. 51, 1104 (1964)
(49) L.J.Bellamy:" UR-Spektrum und chem.Konstitution"; D.Steinkopff Verlag, Darmstadt 1966

(50) R.C.Lord und G.J.Thomas, Jr.: Spectrochim.Acta 23A, 2551 (1967)
(51) M.Tsuboi: J.Polymer.Sci. C7, 125 (1963)
(52) M.Falk und P.Giguere: Can.J.Chem. 35, 1195 (1957)
(53) T.Shimanouchi, M.Tsuboi und Y.Kyogoku in: Advances in chemical Physics VII, 435 (1964)
(54) V.Vetterl und W.Guschlbauer: Arch.Biochem.Biophys. 148, 130 (1972)
(55) M.Tsuboi, M.Matsuo, T.Shimanouchi und Y.Kyogoku: Spectrochim. Acta 19, 1617 (1963)
(56) G.J.Thomas, Jr.: Biochim.Biophys.Acta 213, 417 (1970)
(57) P.O.P.Ts'o: The physiochemical basis of interactions of nucleic acids; in: Molecular association in biology; ed. B.Pullman
(58) S.Arnott, S.D.Dover und A.J.Wonacott: Acta Cryst. B25, 2192 (1969)
(59) T.Sato, Y.Kyogoku, S.Higuchi, Y.Mitsui, Y.Iitaka, M.Tsuboi und K.Miura: J.Mol.Biol. 16, 180 (1966)
(60) M.Tsuboi: Appl.Spectr.Rev. 3, 45 (1969)
(61) T.Miyazawa: J.Chem.Phys. 32, 1647 (1960)
(62) T.Miyazawa: J.Chem.Phys. 35, 693 (1961)
(63) T.Miyazawa, Y.Ideguchi und K.Fukushima: J.Chem.Phys. 38, 2709 (1963)
(64) M.Tsuboi, Y.Matsuo, T.Shimanouchi und Y.Kyogoku: Spectrochim. Acta 19, 1617 (1963)
(65) H.Berthod und B.Pullman: Biochim.Biophys.Acta 246, 359 (1971)
(66) H.R.Wilson und A.Rahman: J.Mol.Biol. 56, 129 (1971)
(67) K.G.Wagner: Vortrag im biophys.Kolloquium München 1972
(68) G.Melcher: Biophysik 7, 29 (1970)
(69) A.Rabczenko und D.Shugar: Acta Biochim.Polonica 19, 89 (1972)
(70) F.B.Howard, J.Frazier und H.T.Miles: Proc.Nat.Acad.Sci. 64, 451 (1969)

(71) G.Felsenfeld u. S.Huang: Biochim.Biophys.Acta 34, 234 (1959)
(72) J.Shack, R.J.Jenkins und J.M.Thompsett: J.Biol.Chem. 203, 373 (1953)
(73) R.F.Beers, Jr. und R.F.Steiner: Nature 179, 1076 (1957)
(74) M.Riley, B.Maling und M.Chamberlin: J.Mol.Biol. 20, 359 (1966)
(75) J.M.Read und J.H.Goldstein: J.Amer.Chem.Soc. 87, 3440 (1965)
(76) E.G.Weidemann und G.Zundel: Z.Naturforschg. 25a, 627 (1970)
(77) R.Janoschek, E.G.Weidemann, H.Pfeiffer und G.Zundel: J. Amer.Chem.Soc. 94, 2387 (1972)
(78) E.G.Weidemann und G.Zundel: Z.Physik 198, 288 (1967)
(79) G.Zundel: Allgem.Prakt.Chem. 21, 329 (1970)
(80) W.Sessler und G.Zundel: Chem.Phys.Letters 14, 356 (1972)
(81) W.Sessler: Z.Physik (Frankfurt) 79, 180 (1972)
(82) G.Zundel und J.Mühlinghaus: Z.Naturforschg. 26b, 546 (1971)
(83) G.C.Y.Lee und S.I.Chan: J.Amer.Chem.Soc. 94, 3218 (1972)
(84) G.C.Y.Lee, J.H.Prestegard und S.I.Chan: J.Amer.Chem.Soc. 94, 951 (1972)

L e b e n s l a u f

Am 21. September 1938 wurde ich als Sohn des Rechtsanwaltes Gert J. Kölkenbeck und seiner Ehefrau Else, geb. Görlitz, in Berlin-Wilmersdorf geboren. Nach fünfjährigem Besuch der Volksschule in Planegg trat ich 1950 in das Realgymnasium Gräfelfing ein. Von der 5. bis zur 7. Klasse besuchte ich das Nymphenburger Gymnasium in München-Gern. Im Jahre 1957 unterbrach ich meine Schulzeit für zwei Jahre und arbeitete im Zentrallaboratorium der Firma Siemens u. Halske als Praktikant. 1959 trat ich dann in das Wittelsbacher Gymnasium in München ein und legte dort 1961 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München. Im Mai 1966 unterzog ich mich dem Diplomchemiker-Vorexamen und im Oktober 1969 dem mündlichen Teil der Diplomchemiker-Hauptprüfung. Die Diplomarbeit führte ich am Institut für Anorganische Chemie durch. Seit September 1970 war ich am Physikalisch-Chemischen Institut mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.